



Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας

Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση

Διπλωματική Εργασία

Αναλυτικές τεχνικές για έλεγχο εξαρτησιογόνων ουσιών
σε τρίχες

Σπυρίδων Βλάχος

Επιβλέπων καθηγητής: Χρήστος Κοντογιάννης

Πάτρα, Ιούνιος 2024

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του φοιτητή («συγγραφέας/δημιουργός») που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Ιδιοκτησίας του συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του συγγραφέα/δημιουργού. Ο συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων

Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο "Αναλυτικές τεχνικές για έλεγχο εξαρτησιογόνων ουσιών σε τρίχες" εστιάζει στη χρήση αναλυτικών μεθόδων για τον εντοπισμό εξαρτησιογόνων ουσιών σε δείγματα τρίχας. Στο πρώτο κεφάλαιο, η εργασία περιγράφει τη δομή και τη σύσταση της τρίχας, συμπεριλαμβάνοντας την ανατομία και τους τύπους τρίχας καθώς και τον κύκλο ζωής της τρίχας. Αναλύεται η διαδικασία εναπόθεσης ουσιών στη τρίχα, οι παράγοντες που την επηρεάζουν, και τα πλεονεκτήματα της χρήσης τριχών έναντι άλλων βιολογικών δειγμάτων για ανάλυση. Επίσης, γίνεται αναφορά στις ουσίες που μπορούν να ανιχνευθούν μέσω αυτής της μεθόδου. Στο δεύτερο κεφάλαιο, παρουσιάζονται οι μέθοδοι δειγματοληψίας και επεξεργασίας δειγμάτων, καθώς και οι τεχνικές ποιοτικού ελέγχου που χρησιμοποιούνται. Περιγράφονται οι αναλυτικές μέθοδοι που εφαρμόζονται για τον έλεγχο των ουσιών, όπως η υγρή χρωματογραφία και η φασματομετρία μάζας, και οι διαδικασίες διασφάλισης ποιότητας και επικύρωσης των μεθόδων. Το τρίτο κεφάλαιο περιλαμβάνει την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας σχετικά με τη διάρκεια ανίχνευσης ουσιών όπως η κοκαΐνη, τα κανναβινοειδή και οι αμφεταμίνες σε δείγματα μαλλιών. Γίνονται αναφορές σε συγκεκριμένες μελέτες και μεθοδολογίες, όπως η χρήση της υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (LC-MS/MS) και της αέριας χρωματογραφίας (GC-MS), για την ποσοτικοποίηση και ταυτοποίηση των ουσιών αυτών. Η εργασία καταλήγει στο τέταρτο κεφάλαιο με μια ανασκόπηση των συμπερασμάτων και προτάσεων για μελλοντική έρευνα. Τονίζεται η σημασία της συνεχούς ανάπτυξης και βελτίωσης των αναλυτικών τεχνικών για τον έλεγχο εξαρτησιογόνων ουσιών, καθώς και η ανάγκη για περαιτέρω μελέτες που θα εξετάσουν την αποτελεσματικότητα και την αξιοπιστία των μεθόδων αυτών σε διαφορετικά περιβάλλοντα και συνθήκες.

Abstract

The thesis entitled "Analytical Techniques for the Detection of Addictive Substances in Hair" by Spyridon Vlachos focuses on the application of sophisticated analytical methods for the identification of addictive substances in hair samples. This research was conducted under the supervision of Professor Christos Kontogiannis at the Hellenic Open University. The first chapter provides an in-depth examination of the structure and composition of hair, encompassing its anatomy, various types, and life cycle. It elaborates on the mechanisms of substance deposition within hair, the factors that influence this process, and the advantages of employing hair samples over other biological specimens for analytical purposes. Additionally, it identifies the types of substances that can be detected using this methodology. In the second chapter, the thesis outlines the methodologies for sampling and processing hair specimens, along with the quality control techniques employed to ensure accuracy and reliability. It details the analytical techniques utilized for substance detection, such as liquid chromatography and mass spectrometry, and describes the procedures for quality assurance and method validation. The third chapter presents a comprehensive literature review concerning the detection windows of substances such as cocaine, cannabinoids, and amphetamines in hair samples. It references specific studies and methodologies, including the use of liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), for the quantification and identification of these substances. The final chapter synthesizes the findings and offers recommendations for future research. It underscores the necessity for ongoing development and refinement of analytical techniques for the detection of addictive substances, and advocates for further investigations to assess the efficacy and reliability of these methods under varying conditions and environments.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

Περίληψη.....	3
Abstract	4
1ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ.....	4
1.1 Σύσταση τρίχας.....	4
1.1.1 Ανατομία τρίχας.....	4
1.1.2 Τύπος τρίχας	5
1.1.3 Κύκλος τρίχας	6
1.2 Εναπόθεση ουσιών στη τρίχα	7
1.2.1 Τρόποι διάχυσης ουσιών	7
1.2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την εναπόθεση ουσιών στις τρίχες	8
1.3 Πλεονεκτήματα τρίχας έναντι άλλων βιολογικών δειγμάτων	9
1.4 Ουσίες που ανιχνεύονται	13
2ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ	14
2.1 Δειγματοληψία και επεξεργασία δείγματος	14
2.2 Ποιοτικός έλεγχος	16
2.3 Μέθοδοι ανάλυσης.....	16
2.4 Διασφάλιση ποιότητας και επικύρωση μεθόδου.....	18
2.5 Χρόνος έκθεσης σε ουσίες.....	20
3ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ	21
3.1 Διάρκεια ανίχνευσης κοκαΐνης και μεταβολιτών στα μαλλιά μετά διακοπή της κατάχρησης	21
3.2 Προσδιορισμός κανναβινοειδών σε δείγματα νυχιών και μαλλιών	24
3.3 Ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση αμφεταμινών και οπιούχων σε ανθρώπινα μαλλιά με LC-MS	25
3.4 Γρήγορος και εξαιρετικά ευαίσθητος προσδιορισμός των μεταβολιτών της τετραϋδροκανναβινόλης (THC) στα μαλλιά χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας πολλαπλών σταδίων (LC-MS ³)	28
3.5 Ταυτόχρονος προσδιορισμός αιθυλογλυκουρονιδίου, κοκαΐνης, κοκααιθυλενίου και βενζοϋλεκγονίνης στα μαλλιά με χρήση LC-MS/MS	30
3.6 Ανάπτυξη μεθόδου UPLC-MS/MS για ανάλυση 16 συνθετικών οπιοειδών σε μαλλιά και αξιολόγηση ιστορικού σε χρήστες φαινανύλης.....	33
3.7 Ανίχνευση 6-μονοακετυλομορφίνης σε δείγμα μαλλιών χρηστών ηρωίνης με GC/MS	38
3.8 Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου GC-MS για τον προσδιορισμό διεγερτικών τύπου αμφεταμίνης και κεταμίνης σε ανθρώπινα μαλλιά.....	41
3.9 Ποιοτικός καθορισμός αμφεταμινών, κοκαΐνης και οπιοειδών στην ανθρώπινη τρίχα μέσω αέριας χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας	45
4ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ	49
Βιβλιογραφία.....	56

Συντομογραφίες

MDMA: 3,4-μεθυλαινοδιοξυμεθαμφεταμίνη

MDEA: Παρα-μεθοξαμφεταμίνη

BZE: Βενζοϋλεκγονίνης

CE: Κοκοαιθυλένιο

AP: Αμφεταμίνη

MA: Μεθαμφεταμίνη

MOR: Μορφίνη

COD: Κωδεΐνη

6-AM: 6-ακετυλομορφίνη

6-AC: 6-ακετυλοκωδεΐνη

GC: Αέρια χρωματογραφία

HPLC: Υγρή χρωματογραφία

THC: Δ9-τετραϋδροκανναβινόλης

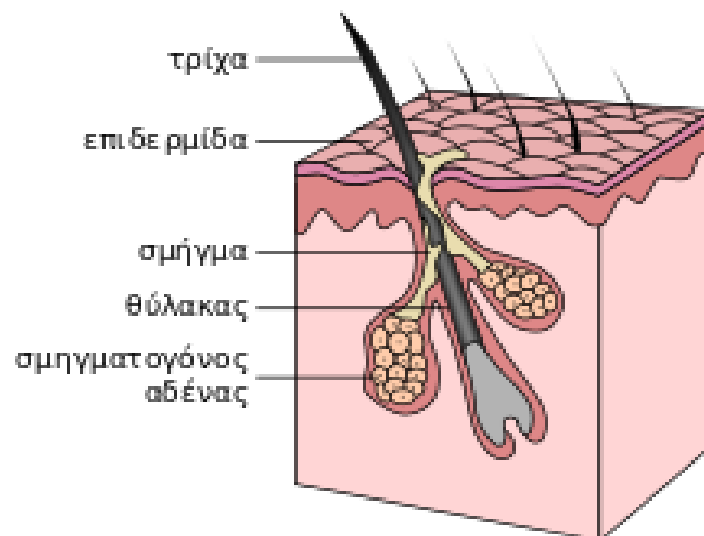
1ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ (Η ΤΡΙΧΑ ΩΣ ΦΟΡΕΑΣ ΝΑΡΚΩΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ)

1.1 Σύσταση τρίχας

1.1.1 Ανατομία τρίχας

Οι τρίχες είναι ένα μοναδικό χαρακτηριστικό που απαντώνται σε όλα τα θηλαστικά, αλλά όχι σε όλα τα ζώα. Προσδίδει πολύ σημαντικές λειτουργίες στον οργανισμό, οι οποίες περιλαμβάνουν την προστασία του από είσοδο μικροοργανισμών, καθώς και τη διατήρηση της θερμοκρασίας του. Για παράδειγμα, τα φρύδια και οι βλεφαρίδες αποτρέπουν την είσοδο μικροοργανισμών και ιδρώτα στα μάτια. [1]



Εικ.1: Απεικόνιση τρίχας και δέρματος [2]

Η τρίχα είναι προσκολλημένη στην επιδερμίδα. Εξωτερικά, είναι λεπτή και εύκαμπτη και αποτελείται από νεκρά, πλήρως κερατινοποιημένα επιθηλιακά κύτταρα. Οι δύο βασικές δομές της τρίχας είναι η ρίζα (follicle) και το ελεύθερο στέλεχος (shaft), το οποίο είναι ορατό στην επιδερμική επιφάνεια. Το ελεύθερο στέλεχος αποτελείται από

ένα φλοιό, κυρίως από κερατίνη, μια πρωτεΐνη που συμβάλει στην ανάπτυξη του στελέχους, επιδερμικά κύτταρα και σε ορισμένες περιπτώσεις στο εσωτερικό του συναντάμε τον μυελό της τρίχας (medulla). Ο μυελός παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη σύνθεση της τρίχας, καθώς και στις ιδιότητες της.

Με τον όρο ρίζα εννοούμε το μη ορατό τμήμα, το οποίο εντοπίζεται στο εσωτερικό του τριχοθυλακίου και αποτελεί τη βασική δομή για την ανάπτυξη της τρίχας. Στο κατώτερο τμήμα του τριχοθυλακίου ο βολβός, ο οποίος έχει τριχοειδή αγγεία, τα οποία παρέχουν όλα τα θρεπτικά συστατικά για τη σωστή ανάπτυξη της τρίχας. Επίσης σε αυτό το σημείο βρίσκονται και οι υποδοχείς των ανδρογόνων, μιας ορμόνης η οποία διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ποιότητα και την ποσότητα των τριχών στο τριχωτό της κεφαλής. Ο βολβός της τρίχας διακρίνεται σε δύο τμήματα, το ένα αποτελείται από διαφοροποιημένα κύτταρα και το άλλο από κύτταρα που βρίσκονται σε διαδικασία διαφοροποίησης. Οι δύο περιοχές αυτές χωρίζονται σε ένα κρίσιμο σημείο, τη γραμμή Auber. Κάτω από τη γραμμή βρίσκεται η μήτρα, όπου πραγματοποιείται μιτωτική διαίρεση των κυττάρων, τα οποία στη συνέχεια κατευθύνονται προς το ανώτερο μέρος του βολβού, όπου αυξάνονται σε όγκο και επιμηκύνονται κάθετα.

Το άνω μέρος του βολβού χωρίζεται σε τέσσερα τμήματα. Πάνω ακριβώς από τη γραμμή Auber υπάρχει ένα ευρύ τμήμα, που αποτελεί την περιοχή προ-επιμήκυνσης, όπου τα κύτταρα τοποθετούνται κάθετα και γίνονται ελαφρώς μεγαλύτερα. Ακολουθεί η περιοχή της επιμήκυνσης, όπου η διάμετρος του βολβού γίνεται στενότερη και παρατηρούνται κύτταρα εμφανώς επιμηκυσμένα. Στη συνέχεια, βρίσκεται η περιοχή της προ-κερατινοποίησης, όπου παρατηρούνται λεπτές, διακριτές ίνες και ινίδια να χρωματίζονται. Τέλος, η κερατινοποιημένη περιοχή, όπου τα κύτταρα υαλοποιούνται και η κερατίνη της τρίχας σταθεροποιείται. [3]

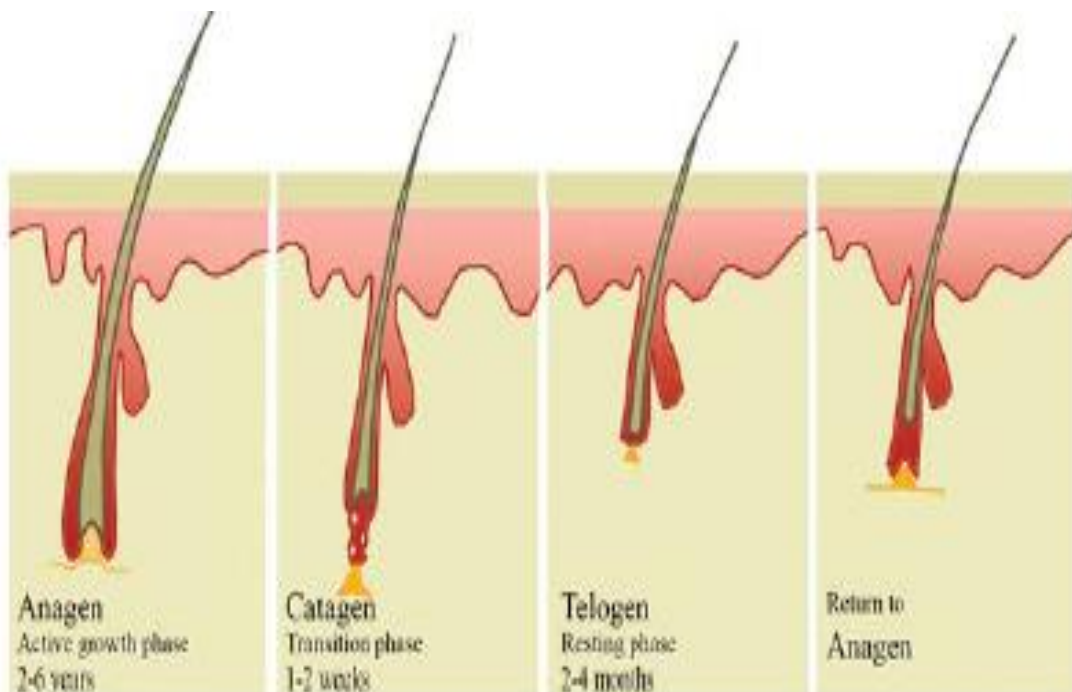
1.1.2 Τύπος τρίχας

Υπάρχουν αρκετοί τύποι ελεύθερων στελεχών τριχών που υπάρχουν στο σώμα: lanugo, vellus, τελικές. Lanugo τρίχες είναι οι πρώτες τρίχες που σχηματίζονται στο έμβρυο. Είναι πολύ λεπτές, μαλακές και συνήθως χωρίς χρώμα. Συνήθως, πέφτουν πριν τη γέννηση ή μένουν στο βρέφος για τις πρώτες βδομάδες. Οι vellus είναι κοντές, λεπτές και ελαφρώς χρωματισμένες τρίχες, συνήθως χωρίς μυελό. Εμφανίζονται συνήθως σε

παιδιά και ενήλικες γυναίκες. Οι τελικές είναι πυκνές, μακριές και σκούρες τρίχες. Τα ανδρογόνα παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναλογία ρίζας και ελεύθερου άκρου της ρίζας. Τα τερματικά μαλλιά διαφέρουν ανάλογα με τη περιοχή του σώματος που βρίσκονται. [4]

1.1.3 Κύκλος τρίχας

Ο κύκλος της τρίχας αποτελείται από τρεις διαδοχικές φάσεις: αναγενής, καταγενής και τελογενής. Η διάρκεια κάθε φάσης αλλάζει, βασιζόμενη στη περιοχή του σώματος, στις ορμόνες και την ηλικία του ατόμου. Η αναγενής φάση διαρκεί από 4 έως 8 έτη και στην φάση αυτή παρατηρείται συνεχής κυτταρική διαίρεση και ανάπτυξη των τριχών. Στην καταγενή φάση σταματά η ανάπτυξη της τρίχας καθώς και η κυτταρική διαίρεση. Στην τελογενή φάση τα τριχοθυλάκια αδυνατίζουν ώσπου αποπίπτουν. Η συγκεκριμένη φάση διαρκεί από 4 έως 6 μήνες. Σύμφωνα με μελέτες, περίπου το 90% των τριχών της κεφαλής βρίσκεται σε αναγενή φάση, το 10% σε τελογενή και λιγότερο από 1% σε καταγενή. [5]



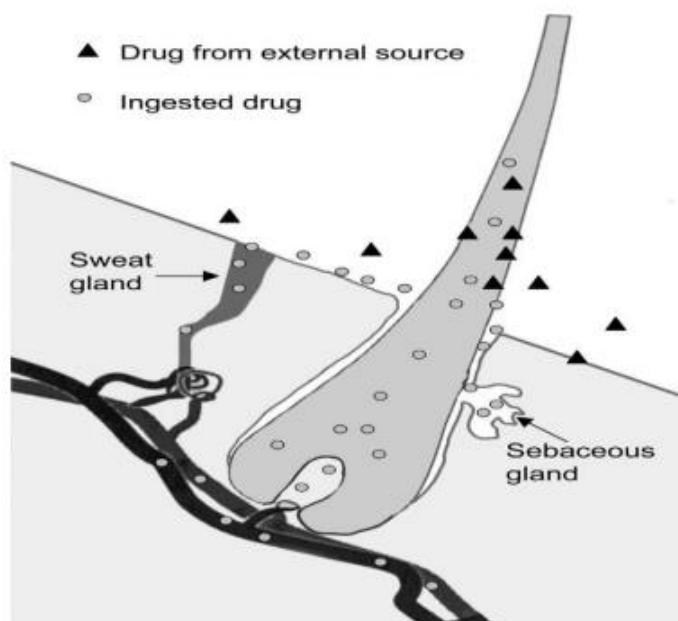
Εικ.2: Ο κύκλος της τρίχας [1]

1.2 Εναπόθεση ουσιών στη τρίχα

1.2.1 Τρόποι διάχυσης ουσιών

Το πιο απλό μοντέλο εναπόθεσης ουσιών στη τρίχα είναι μέσω παθητικής διάχυσης, κατά την οποία η ουσία διαχέεται παθητικά μέσω των αναπτυσσόμενων κυττάρων στη ρίζα. Ένα πολυπλοκότερο μοντέλο, και αυτό που φαίνεται να συμβαίνει στη πραγματικότητα, είναι η εναπόθεση ουσιών μέσω της κυκλοφορίας κατά τον σχηματισμό των τριχών, μέσω του ιδρώτα και του σμήγματος και τέλος από το εξωτερικό περιβάλλον.

Σημαντικός παράγοντας είναι επίσης η λιποδιαλυτότητα του φαρμάκου για να προσδιοριστεί ο ρυθμός μεταφοράς του. Η παθητική μεταφορά προς τα νέα κύτταρα (αναγενής), από τη κυκλοφορία του αίματος μέσω της κυτταρικής μεμβράνης στον βολβό, συντελεί στην επιμήκυνση και μετακίνηση των κυττάρων έξω από τον θύλακα και στη τελική κερατινοποίηση τους, με αποτέλεσμα το φάρμακο να παγιδεύεται και παραμένει σταθερό και ανενεργό καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής της τρίχας. [6]



Εικ3.: Οδοί εναπόθεσης [7]

Το χρώμα των μαλλιών παίζει επίσης ρόλο στην ενσωμάτωση της ουσίας και οι μηχανισμοί δέσμευσης μπορεί να διαφέρουν για κάθε περίπτωση. Μεγάλη σημασία έχει η συγγένεια της μελανίνης με την δομή της εκάστοτε ουσίας. Τα επίπεδα συγκέντρωσης στα μαλλιά μπορεί να εξαρτώνται από το περιβάλλον στο οποίο εκτίθενται. Το χρώμα των μαλλιών επηρεάζει την ανάλυση, καθώς έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι ουσίες, όπως αυτές που εξετάζονται στη βιβλιογραφία, ενσωματώνονται καλύτερα και ανιχνεύονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σκούρα παρά σε ανοιχτόχρωμα ή λευκά μαλλιά (Kintz, 2014). Οι λόγοι για το φαινόμενο αυτό είναι ότι τα μελανοκύτταρα έχουν μειωμένο pH που οδηγεί σε φαρμακοκινητική συσσώρευση βασικών φαρμάκων και ότι τα βασικά φάρμακα προσροφώνται καλύτερα στη μελανίνη, πιθανότατα από αλληλεπίδραση φόρτισης-μεταφοράς. Αν και το σαμπουάν δεν επηρεάζει σημαντικά τις συγκεντρώσεις στην τρίχα, υπάρχει περίπτωση οι υδρόφιλες ενώσεις (π.χ. αιθυλο-γλυκουρονίδιο) να επηρεαστούν. [8]

1.2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την εναπόθεση ουσιών στις τρίχες

Η μοναδική φυσιολογία και δομή της τρίχας επιτρέπει πολλαπλές οδούς για ενσωμάτωση και αποβολή ουσιών. Η πιο συνηθισμένη διαδρομή είναι μέσω της κυκλοφορίας του αίματος και δίνει απαντήσεις σχετικά με τον χρόνο λήψης ή ακόμα και με τη δόση που λαμβάνεται. Τα φάρμακα και οι μεταβολίτες τους κατανέμονται σε όλο το σώμα κυρίως μέσω παθητικής διάχυσης από το αίμα. Λόγω της ταχείας κυτταρικής διαίρεσης που πραγματοποιείται στα κύτταρα του θύλακα, είναι φανερό ότι αποτελεί σημείο με πολύ καλή παροχή αίματος. Η βάση του τριχοθυλακίου θεωρείται το κύριο μέσο εναπόθεσης ουσιών.

Ένας ακόμα τρόπος εναπόθεσης φαρμάκου είναι μέσω του ιδρώτα. Ο Henderson μετά από χορήγηση κωδεΐνης σε άτομα, διαπίστωσε ότι εμφανίστηκε στις τρίχες μετά από 24 ώρες. Ο χρόνος αυτός είναι πολύ μικρός για να έχει μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Συνεπώς, η ενσωμάτωση ορισμένων ουσιών στις τρίχες μπορεί να γίνει και μέσω της διάχυσης από τον ιδρώτα. Τέλος, ουσίες μπορούν να ενσωματωθούν επίσης και από το εξωτερικό περιβάλλον (ρύπανση, χημικές διεργασίες).

Ο ρυθμός εναπόθεσης μέσω της κυτταρικής μεμβράνης εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες πέρα από το μέγεθος και τη δομή του φαρμάκου. Εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη διαβάθμιση pH στο πλάσμα και στο κύτταρο και από τη λιποφιλικότητα του φαρμάκου.

Τα φάρμακα είναι είτε ασθενείς βάσεις, είτε ασθενή οξέα, τα οποία μπορούν να οξειδωθούν ή να αναχθούν ανάλογα με το pH. Το pH του πλάσματος είναι 7,3, ενώ στα κερατινοκύτταρα είναι χαμηλότερο, κυμαίνεται από 3 έως 6. Οι βασικές ουσίες, σε αντίθεση με τις όξινες, μπορούν να συσσωρευτούν στα κερατινοκύτταρα και στα μελανοκύτταρα, καθώς ευνοείται η διάχυση σύμφωνα με τη διαβάθμιση του pH. Μόλις εισέλθει στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου πρωτονιόνεται και δεν μπορεί να διαχυθεί πίσω στο πλάσμα. Μόνο μόρια του φαρμάκου που δεν είναι συνδεδεμένα με τις πρωτεΐνες του πλάσματος μπορούν να διαχυθούν με αυτόν τον τρόπο. Η διαβάθμιση αυτή του pH, κάνει πιο εύκολη την ενσωμάτωση των βασικών μορίων έναντι των όξινων. Τα κατιονικά φάρμακα πιστεύεται ότι συνδέονται ιοντικά με το πολυανιονικό μόριο της μελανίνης. Επίσης, αρκετά ναρκωτικά σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς, όπως πχ η αμφεταμίνη.

Η λιποφιλικότητα, αποτελεί επίσης έναν παράγοντα ενσωμάτωσης. Όσο μεγαλύτερη είναι η αναλογία λιπιδίων/νερού σε μια ουσία, τόσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου στη κυτταρική μεμβράνη, άρα και τόσο πιο γρήγορη η διάχυση του. [9]

1.3 Πλεονεκτήματα τρίχας έναντι άλλων βιολογικών δειγμάτων

Οι τρίχες χρησιμοποιούνται συχνά ως εναλλακτική ή συμπληρωματική τεχνική για εντοπισμό τοξικών ουσιών, καθώς παρουσιάζουν μια σειρά πλεονεκτημάτων σε σχέση με άλλα δείγματα όπως είναι τα ούρα και το αίμα. Η μήτρα της τρίχας είναι σταθερή και παρουσιάζει ένα μεγαλύτερο παράθυρο ανίχνευσης, πλαισιώνοντας διάστημα πολλών μηνών, σε σχέση με το παράθυρο ανίχνευσης στο αίμα και στα ούρα που είναι μόλις λίγων ημερών. Επίσης, όταν η ουσία και οι μεταβολίτες της εναποτεθούν στην τρίχα, δεν παρατηρείται επιπρόσθετος μεταβολισμός από τη κυκλοφορία του αίματος, το σμήγμα ή τον ιδρώτα. Επιπλέον, η τρίχα είναι ένα δείγμα, το οποίο δεν παραποιείται εύκολα. Τέλος, η δειγματοληψία είναι μη επεμβατική, χωρίς να χρειάζεται εξειδικευμένο προσωπικό. [10] Η πρώτη απόπειρα ανάλυσης ουσιών σε τρίχα έλαβε

χώρα στις αρχές της δεκαετίας του 1950 όπου ανιχνεύθηκε Αρσενικό σε τρίχες του Ναπολέοντα. [11]

Σε αντίθεση με τα συμβατικά δείγματα, η δοκιμή τριχών μπορεί να παρέχει δεδομένα σχετικά με τη μακροχρόνια έκθεση σε φάρμακα. Το τυπικό δείγμα μαλλιών, ένα κομμάτι τριών εκατοστών κοντά στο τριχωτό της κεφαλής, προσδιορίζει τη χρήση ναρκωτικών ουσιών έως και τρεις μήνες πριν. Οι τρίχες του σώματος δίνουν αποτελέσματα με ακόμα μεγαλύτερο παράθυρο ανίχνευσης. Σε αντίθεση με την ανάλυση ούρων, που ανιχνεύει χρήση ουσιών για τις τελευταίες 48 με 72 ώρες. [12]

Η ενσωμάτωση του φαρμάκου στις τρίχες είναι πολύ σταθερή σε κατάλληλες θερμοκρασίες. Υπάρχουν παραδείγματα που δείχνουν ότι ουσίες μπορούν να ανιχνευθούν ακόμα και μετά από πολλά χρόνια από τον θάνατο κάποιου. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η ανίχνευση οπιούχων στα μαλλιά του ποιητή John Keats, 167 χρόνια μετά τον θάνατο του! Ωστόσο, παρά αυτή τη σταθερότητα, ορισμένες καλλυντικές διεργασίες, όπως το βάψιμο, ακόμα και το πολύ συχνό λούσιμο μειώνουν τη σύνδεση αυτή. Σύμφωνα με μελέτες, η συγκέντρωση ουσιών στη τρίχα μετά από καλλυντικές θεραπείες μειώνεται κατά 50 με 80%. Αυτό συμβαίνει γιατί τα καλλυντικά προϊόντα που χρησιμοποιούνται στις θεραπείες αυτές, περιέχουν ισχυρές βάσεις που μειώνουν τη περιεκτικότητα του φαρμάκου και επηρεάζουν τη σταθερότητα του. [13]

Η ανίχνευση ναρκωτικών ουσιών σε τρίχες είναι μία από τις αποτελεσματικότερες τεχνικές για την ανίχνευση ναρκωτικών ουσιών για μακροπρόθεσμη κατανάλωση, καθώς οι ουσίες αυτές κυκλοφορούν στο αίμα και ενσωματώνονται στις τρίχες κατά την διάρκεια ανάπτυξής τους. Η ανάλυση τριχών της κεφαλής είναι μία πολλά υποσχόμενη μέθοδος , καθώς ουσίες όπως ναρκωτικά, στεροειδή , φυτοφάρμακα , αλκοόλ και άλλες ουσίες μπορεί να μην ανιχνεύονται στα ούρα είτε στο αίμα είτε στο στοματικό υγρό λόγω μικρή βιοδιαθεσιμότητας των αναλυτών από τα προαναφερθέντα δείγματα. Ένα αξιοσημείωτο παράδειγμα αποτελεί η ανίχνευση αυξητικών παραγόντων/ στεροειδών από τρίχες ζώων , και συγκεκριμένα εστέρων που προέρχονται από φυσικές ορμόνες (χρήση HPLC-MS/MS) [15].

Παρόλο που η ανάλυση τριχών είναι μία αξιόπιστη τεχνική, αξίζει να αναφέρουμε και τα αρνητικά στοιχεία. Η τρίχα δεν είναι ομοιογενής μήτρα και χρίζει προσεκτικό τρόπο δειγματοληψίας. Η ανίχνευση ουσιών, προϋποθέτει ότι η ένωση που θέλουμε να εντοπίσουμε, πρέπει να έχει συγκεκριμένη δομή για να ενσωματωθεί στη τρίχα , η

οποία καθορίζει την συγγένεια με την μελανίνη , την λιποφιλικότητα και την διαπερατότητα της μεμβράνης.[16].Τα λιπόφιλα φάρμακα βρίσκονται συνήθως στο σύμπλεγμα της κυτταρικής μεμβράνης. Για παράδειγμα, τα γκρίζα μαλλιά τα οποία είναι μείγμα από λευκά και χρωματισμένα μαλλιά έδειξαν δέκα φορές μεγαλύτερο ποσοστό από τα μη χρωματισμένα με την ίδια έκθεση στο φάρμακο.[17] Το εξωτερικό περιβάλλον πολλές φορές μας οδηγεί σε λανθασμένα συμπεράσματα, καθώς μπορεί να επηρεάσει την συγκέντρωση της ουσίας. Το δείγμα μας και συγκεκριμένα η τρίχα μπορεί να μολυνθεί από τον αέρα και ένα κραυγαλέο παράδειγμα είναι η κοκαΐνη. Για τον λόγο αυτό προτάθηκε η ανίχνευση μεταβολιτών της κοκαΐνης (νορκοκοκαΐνης, κοκοαιθελενίου)[18]. Τέλος το συχνό λούσιμο μπορεί να παρασύρει τα υδρόφιλα τμήματα του φαρμάκου.

Παρακάτω παρατίθεται ένας πίνακας που συγκεντρώνει τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των βιολογικών δειγμάτων για την ανάλυση τοξικών ουσιών:

Δείγμα	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Ούρα	<ul style="list-style-type: none"> ο πιο μελετημένος και αποδεκτός τρόπος καλά τυποποιημένες και επικυρωμένες μέθοδοι λιγότερο ακριβός 	<ul style="list-style-type: none"> ειδική εγκατάσταση συλλογής υψηλές πιθανότητες νοθείας δείγματος επεμβατική συλλογή με εποπτεία συντομότερο παράθυρο ανίχνευσης: 13 ημέρες καμία σχέση συγκέντρωσης φαρμάκου και δόσης η συγκέντρωση του φαρμάκου εξαρτάται από την κατάσταση ενυδάτωσης
Αίμα	<ul style="list-style-type: none"> θετικό τεστ αποδεικνύει πρόσφατη χρήση λήψη δείγματος υπό επίβλεψη <ul style="list-style-type: none"> όχι νοθεία 	<ul style="list-style-type: none"> η συλλογή δειγμάτων χρειάζεται εκπαιδευμένο προσωπικό συντομότερο παράθυρο ανίχνευσης ναρκωτικών

Δείγμα	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Στοματικό υγρό	<ul style="list-style-type: none"> • πρόσφατη λήψη • μη επεμβατική, εύκολη λήψη δείγματος • χαμηλή πιθανότητα νοθείας 	<ul style="list-style-type: none"> • συντομότερο παράθυρο ανίχνευσης • μόλυνση από παθητική έκθεση • ακριβείς και λιγότερο καθιερωμένες αναλυτικές μέθοδοι • στο σύνδρομο ξηροστομίας, το δείγμα μπορεί να μην είναι διαθέσιμο • υψηλή μεταβλητότητα συλλογής δειγμάτων
Ιδρώτας	<ul style="list-style-type: none"> • μη επεμβατική, εύκολη λήψη δείγματος • παρέχει αθροιστική έκθεση ουσιών για λίγες μέρες ή βδομάδες 	<ul style="list-style-type: none"> • διακύμανση στην παραγωγή ιδρώτα • ακριβές και λιγότερο καθιερωμένες αναλυτικές μέθοδοι • δεν υπάρχουν διαθέσιμες δοκιμές για το σημείο συλλογής
Τρίχα	<ul style="list-style-type: none"> • μεγάλο παράθυρο ανίχνευσης από εβδομάδες έως μήνες • μη επεμβατική, εύκολη λήψη δείγματος • πολύ χαμηλή πιθανότητα νοθείας δείγματος • δείγμα σταθερό για χρόνια • λήψη δείγματος ακόμα και μετά θάνατον • είναι δυνατή η ανάκληση δειγμάτων από την ίδια πηγή 	<ul style="list-style-type: none"> • όχι για πρόσφατη χρήση ναρκωτικών • το δείγμα ενδέχεται να μην είναι διαθέσιμο • αλλοίωση αποτελεσμάτων από βάψιμο μαλλιών • ακριβείς αναλυτικές μέθοδοι • πιθανή εξωτερική μόλυνση • η νόθευση είναι δυνατή με τη δειγματοληψία πριν τη συλλογή

Πίνακας 1: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα ανάλυσης τοξικών ουσιών στα βιολογικά δείγματα [14]

1.4 Ουσίες που ανιχνεύονται

Οι ουσίες που ελέγχονται περισσότερο με δείγμα μαλλιών, αφορούν συνήθως ναρκωτικές ουσίες, όπως κανναβινοειδή, κοκαΐνη, οπιοειδή, αμφεταμίνες και βενζοδιαζεπίνες. Το δείγμα τριχών, όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, παρέχει πληροφορίες για την έκθεση κάποιου ατόμου, ακόμα και μήνες πριν τη δειγματοληψία. Μια πρώτη διάκριση γίνεται βάσει της φύσης των ουσιών. Οι αμφεταμίνες και η κοκαΐνη, λόγω της βασικότητας που παρουσιάζουν, ενσωματώνονται στις τρίχες σε μεγαλύτερο βαθμό, σε σχέση με τα κανναβινοειδή και τις βενζοδιαζεπίνες. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα όρια ανίχνευσης ναρκωτικών στα τεστ που διεξάγονται με δείγμα τριχών. [19]

Ακολουθεί ο πλήρης πίνακας των ουσιών που εξετάστηκαν σε αυτή την εργασία

Ομάδα ουσιών	Ουσίες	Όρια ανίχνευσης (cutoff-ng/mg)
Οπιοειδή	Μορφίνη 6-ακέτυλομορφίνη	0,2
Κοκαΐνη		0,5
Αμφεταμίνη	Αμφεταμίνη Μεθαμφεταμίνη MDMA MDA MDEA	0,2
Κανναβινοειδή	THC THC-COOH	≤0,05 ≤0,2
Βενζοδιαζεπίνες	Βρωμαζεπάμη Νορδιαζεπάμη Λοραζεπάμη Απλαζολάμη Διαζεπάμη	0,05

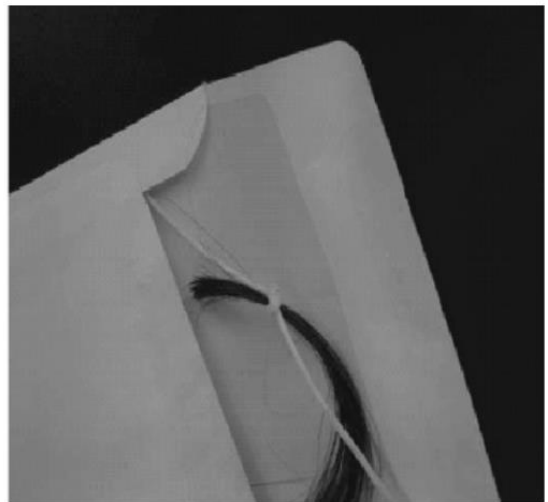
Πίνακας 2: Όρια ανίχνευσης ναρκωτικών στα τεστ που διεξάγονται με δείγμα τριχών [19]

2^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

2.1 Δειγματοληψία και επεξεργασία δείγματος

Για τη συλλογή δείγματος τρίχας δεν υπάρχει κάποια συγκεκριμένη μέθοδος. Τα δείγματα συλλέγονται τυχαία από διάφορα μέρη του σώματος. Ως καλύτερη περιοχή θεωρείται το πίσω μέρος της κεφαλής γιατί σε εκείνη τη περιοχή οι τρίχες που υπάρχουν, βρίσκονται στην ίδια φάση ανάπτυξης, με τον ίδιο ρυθμό ανάπτυξης και δεν επηρεάζονται τόσο από την ηλικία ή το φύλο.



Εικ. 4: Λήψη δείγματος τριχών [20]

Οι τρίχες πρέπει να κόβονται όσο το δυνατόν πιο κοντά στο τριχωτό της κεφαλής. Το χρώμα, το μήκος και η θέση κοπής πρέπει να σημειώνονται. Στη συνέχεια, το δείγμα μεταφέρεται σε φάκελο από αλουμινόχαρτο ή σε πλαστική σακούλα και διατηρούνται σε ξηρό και σκοτεινό μέρος, σε θερμοκρασία δωματίου. Η ποσότητα του δείγματος που λαμβάνεται εξαρτάται από το φάρμακο που εξετάζεται, καθώς και από το εργαστήριο που διεξάγει τον έλεγχο.

Οι ρύποι στην επιφάνεια της τρίχας δημιουργούν προβλήματα στην ανάλυση. Οι προσμίξεις αυτές μπορεί να είναι προϊόντα περιποίησης (τζελ μαλλιών), ιδρώτας ή

ρύπανση από το περιβάλλον. Αν δεν αφαιρεθούν σωστά μπορεί να επηρεάσουν τον έλεγχο και να μεταβάλλουν πιθανά αποτελέσματα. Για να μειωθεί η πιθανότητα ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων από τέτοιες προσμίξεις, πριν από οποιαδήποτε διεργασία, προηγείται το βήμα της πλύσης. [13]

Οι διαδικασίες που περιγράφονται παραπάνω ισχύουν και για μεταθανάτια λήψη δείγματος. Ωστόσο μπορεί να μην είναι αρκετός ένας φάκελος και να χρειάζεται να συλλεχθούν σε κουτί. Επίσης, εδώ μπορεί να πραγματοποιηθεί και λήψη της ρίζας των τριχών που παρέχει επιπρόσθετες πληροφορίες για τη λήψη ουσιών πριν τον θάνατο. Επίσης, η λήψη δειγμάτων πραγματοποιείται τόσο σε παιδιά, όσο και σε βρέφη, αφού παρέχει ένα πληροφορίες για την έκθεση τους σε τοξικές ουσίες. Από τα μαλλιά ενός βρέφους μπορεί να αποδειχθεί αν η μητέρα έκανε κατάχρηση ναρκωτικών ή αλκοόλ κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης ή του θηλασμού.[21]

Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα χημικά για το πλύσιμο είναι διαλύματα χειρουργικού καθαρισμού, επιφανειοδραστικές ουσίες, ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών αλάτων και οργανικοί διαλύτες. Η διαδικασία απολύμανσης θα πρέπει να περιλαμβάνει τόσο οργανικό όσο και υδατικό στάδιο πλύσης. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο πιο αποτελεσματικός οργανικό διαλύτης είναι η μεθανόλη και ο πιο αποτελεσματικός υδατικός είναι δωδεκυλοθειικό νάτριο. [13]

Μετά την απολύμανση, το δείγμα μαλλιών κονιοποιείται σε έναν μύλο, ή κόβεται σε τμήματα πριν το στάδιο της υδρόλυσης, ή διαλυτοποίησης με αλκαλικό μέσο, όπου ενισχύεται η διαλυτοποίηση της εξεταζόμενης ουσίας. Το σημαντικό σε αυτό το στάδιο είναι η ομογενοποίηση του δείγματος, ανεξάρτητα από ποιον τρόπο θα κοπεί, για να ληφθεί ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα. Εδώ υπάρχει και μία σημαντική διαφορά με το αίμα ή τα ούρα, τα οποία που είναι ομοιογενή δείγματα και κατανέμονται πιο εύκολα για ανάλυση. Οι προσμίξεις εκχυλίζονται και απομακρύνονται πριν την ανάλυση. Το προκύπτον εκχύλισμα μπορεί να αναλυθεί απευθείας χρησιμοποιώντας τεχνικές διαλογής ή να απαιτεί παραπάνω καθαρισμό, ο οποίος γίνεται είτε με υγρή-υγρή εκχύλιση (LLE), είτε με εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE).[20]

2.2 Ποιοτικός έλεγχος

Η εφαρμογή της διασφάλισης ποιότητας αναγνωρίζεται ως θεμελιώδης αρχή για όλα τα εργαστήρια δοκιμών και η διαπίστευση στο διεθνές πρότυπο ISO/IEC 17025 μια απαίτηση του κλάδου. Ένας αριθμός εγγράφων ISO είναι διαθέσιμος για την παροχή καθοδήγησης σχετικά με τις απαιτήσεις επικύρωσης. Οι τυπικές παράμετροι επικύρωσης περιλαμβάνουν τη γραμμικότητα, τα όρια ανίχνευσης, την ποσοτικοποίηση και την ακρίβεια. [21]

Οι μέθοδοι πιστοποίησης για την ανάλυση φαρμάκων στα μαλλιά αντιπροσωπεύουν μια σημαντική πρόκληση για τον αναλυτή σε σχέση με την περιορισμένη διαθεσιμότητα πιστοποιημένων υλικών αναφοράς που διατίθενται για χρήση ως εξωτερικούς ποιοτικούς ελέγχους. Επί του παρόντος, υπάρχουν τρία ευρωπαϊκά προγράμματα δοκιμών επάρκειας για τα μαλλιά, το Society of Hair Testing (SoHT), το HAIRVEQ και το German Society of Toxicological and Forensic Chemistry (GTFCh). Το όφελος αυτών των σχημάτων είναι ότι τα δείγματα παρασκευάζονται χρησιμοποιώντας τρίχες από χρήστες ναρκωτικών, όπου υπάρχουν αρχικά δείγματα αναφοράς. [22]

2.3 Μέθοδοι ανάλυσης

Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου διακυβεύεται σημαντικά από τη χρήση κατάλληλων διαδικασιών εκχύλισης. Πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν η πιθανή επιβλαβής επίδραση στα εν λόγω φάρμακα κατά την επιλογή των διαλυμάτων εκχύλισης. Για παράδειγμα η υδρόλυση ασταθών ενώσεων, όπως για παράδειγμα η κοκαΐνη, φαίνεται να μη παρέχει σωστά αποτελέσματα. Από την άλλη η χρήση της μεθανόλης δεν εμφανίζει τα ίδια προβλήματα, αλλά οι ανακτήσεις είναι χαμηλότερες. [21]

Ο έλεγχος στη τρίχα επιτυγχάνεται μέσω ανοσολογικών ή χρωματογραφικών μεθόδων. Οι ανοσοδοκιμασίες που χρησιμοποιούνται είναι παρόμοιες με αυτές που γίνονται σε βιολογικά υγρά. Στη πρώιμη περίοδο της ανάλυσης των τριχών, ο Baumgartner χρησιμοποίησε ραδιο-ανοσοδοκιμασία για οπιοειδή, κοκαΐνη και φαινυκυκλιδίνη στα μαλλιά. Επίσης, η μέθοδος ELISA, χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό αντίσωμα εντοπίζει μεθαμφεταμίνη σε δείγμα τριχών. Η χρήση χρωματογραφικών τεχνικών, αν και λιγότερο πρακτική για τη διαλογή μεγάλου αριθμού δειγμάτων, έχει το πλεονέκτημα

ότι είναι σε θέση να εξετάζει και να αναγνωρίζει ταυτόχρονα ένα ευρύτερο φάσμα αναλυτών σε μία μόνο ανάλυση. Αυτό είναι ένα σημαντικό πλεονέκτημα όταν πρόκειται για μικρούς όγκους δειγμάτων.

Το προσωπικό των εργαστηρίων πρέπει να διασφαλίζει ότι όλες οι δοκιμές ελέγχου έχουν επαρκή ευαισθησία και ακρίβεια για ανίχνευση ακόμα και χαμηλών συγκεντρώσεων φαρμάκου. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν την ανίχνευση της μητρικής ουσίας, των μεταβολιτών της, καθώς και πιθανών προσμίξεων. Επίσης, όλες οι πιθανές θετικές ανοσολογικές δοκιμές επιβάλλεται να επιβεβαιώνονται, χρησιμοποιώντας πιο ειδικές δοκιμές, όπως για παράδειγμα η φασματομετρία μάζας.

Ο διαχωρισμός και η ανίχνευση των προς ανάλυση ουσιών επιτυγχάνεται με χρωματογραφικές μεθόδους μαζί με φασματομετρία μάζας: αέρια ή υγρή χρωματογραφία με φασματομετρία μάζας (GS-MS, LC-MS). Η φασματομετρία μάζας χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ουσιών σε δείγμα τριχών, καθώς τα επίπεδα φαρμάκου στη τρίχα είναι πολύ χαμηλότερα, από εκείνα που εντοπίζονται στα υπόλοιπα βιολογικά δείγματα. [23]

Η εφαρμογή αέριας χρωματογραφίας για την ανάλυση οπιούχων και κοκαΐνης στα μαλλιά ξεκίνησαν το 1980. Η εφαρμογή του GC-MS ήταν ένα σημείο καμπής στην ανίχνευση φαρμάκων στα μαλλιά, το οποίο παρέχοντας αυξημένη ακρίβεια κατέστη δυνατός ο εντοπισμός των φαρμάκων ακόμα και αν βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Ωστόσο, η GC και η GC-MS γενικά απαιτούν παραγωγοποίηση ουσίας και αναλυτή, πριν από την ανάλυση προκειμένου, να βελτιωθούν οι χρωματογραφικές τους ιδιότητες, η ανιχνευσιμότητα και να ληφθεί ένα πρότυπο κατακερματισμού υψηλότερης μάζας σε εφαρμογές MS. [24]

Στην αεριοχρωματογραφία το δείγμα εξατμίζεται και εγχέεται στην κεφαλή μιας χρωματογραφικής στήλης. Η έκλυση πραγματοποιείται με ροή αδρανούς αερίου, το οποίο αποτελεί την κινητή φάση. Σε αντίθεση με τους περισσότερους τύπους χρωματογραφίας, η κινητή φάση δεν αλληλοεπιδρά με τα μόρια του αναλυτή. Ο μόνος της ρόλος είναι η διακίνηση του αναλυτή κατά μήκος της στήλης. Ο τύπος της αέριας χρωματογραφίας που χρησιμοποιείται για ανάλυση τοξικών ουσιών σε δείγμα τριχών είναι συνήθως η χρωματογραφία αερίου-στερεού (GS), η οποία βασίζεται στη χρήση στερεάς στατικής φάσης, όπου η κατακράτηση των αναλυτών είναι αποτέλεσμα

φυσικής προσρόφησης. Συνήθως, η αέρια χρωματογραφία συνδυάζεται με φασμοτοσκοπικές τεχνικές, που αποτελούν πανίσχυρα αναλυτικά εργαλεία κατάλληλα για ταυτοποιήσεις των συστατικών πολύπλοκων μιγμάτων. Τα όργανα GC/MS έχουν χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση εκατοντάδων συστατικών που βρίσκονται σε φυσικά ή βιολογικά δείγματα. Τυπικά παραδείγματα αποτελούν η ταυτοποίηση των συστατικών της χαρακτηριστικής οσμής στα διάφορα τρόφιμα, η ταυτοποίηση ρυπαντών υδάτων καθώς και οι μελέτες μεταβολιτών φαρμάκων. [25]

Με τη χρήση GC-MS, ένας αριθμός φαρμάκων μπορεί να ανιχνευθούν, π.χ. αμφεταμίνες, κανναβινοειδή, κοκαΐνη, κωδεΐνη, μεθαδόνη, μορφίνη και άλλα οπιούχα. Η ανάλυση με χρήση GC-MS περιλαμβάνει κάποια περίπλοκη εξαγωγή δείγματος και βήματα παραγωγοποίησης. Ωστόσο, είναι μια σημαντική τεχνική για ποιοτική ανάλυση φαρμάκων στην εγκληματολογική επιστήμη

Η υγρή χρωματογραφία είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για την ανάλυση τριχών, με βασικό πλεονέκτημα τη μεγάλη ευαισθησία της, καθώς και την ανίχνευση ουσιών χωρίς παραγωγοποίηση. Τα όργανα της LC/MS καθιστούν δυνατή την ανίχνευση ακόμα και μικρής ποσότητας φαρμάκου στις τρίχες, ακόμα και μετά από εφάπαξ δόση. Για τον λόγο αυτό, αντικαθιστά σταδιακά την αέρια χρωματογραφία, τόσο διαδικασίες διαλογής, όσο και επιβεβαίωσης. Στις μέρες, αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο ως τεχνική εκλογής για ανάλυση τριχών. Μετά την επεξεργασία του δείγματος, ακολουθεί υγρή εκχύλιση και στη συνέχεια εκχύλιση στερεάς φάσης. (SPE, Solid phase extraction) Η εκχύλιση στερεάς φάσης είναι μια τεχνική προετοιμασίας του δείγματος που χρησιμοποιείται πριν την ανάλυση, για να αφαιρεθούν παρεμβαλλόμενες ουσίες που τυχόν θα επηρεάσουν την ανάλυση. Στη συνέχεια το εκχύλισμα εγχέεται απευθείας σε LC/MS για ανάλυση. [13]

2.4 Διασφάλιση ποιότητας και επικύρωση μεθόδου

Η ανάλυση σε δείγματα τριχών έχει αποδειχθεί ένα πολύτιμο εργαλείο για την ανίχνευση ουσιών, τόσο αν το άτομο κάνει χρόνια ή περιστασιακή χρήση, ή ακόμα και αν έχει απλώς εκτεθεί. Η τεχνική αυτή βρίσκει πολλές εφαρμογές σε ιατροδικαστικές αυτοψίες, σε θεραπευτική παρακολούθηση, σε έλεγχο doping και σε εγκλήματα με διευκόλυνση ναρκωτικών (DFC). Κατά τη διερεύνηση εγκλημάτων που σχετίζονται με ναρκωτικά, είναι σημαντικό να γίνει εκτίμηση του χρόνου που έγινε η λήψη της ουσίας.

Οι τρίχες αποτελούν ένα αποτελεσματικό βιολογικό δείγμα για τον προσδιορισμό του χρόνου, καθώς και για τη συχνότητα της χρήσης. [26]

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων είναι απαραίτητη η λήψη ιστορικού καθώς και να διασφαλιστεί ότι όλες οι δοκιμασίες έγιναν βάσει προτύπων, βιβλιογραφίας και των τιμών αποκοπής (cut-off) όπως φαίνονται στον πίνακα 2, για να αποφευχθούν τυχόν θετικώς εσφαλμένα αποτελέσματα. [27]

Τα πρότυπα ποιότητας που ορίζονται από το ISO/IEC 17 025 ή το ISO/IEC 15189 πρέπει να πληρούνται, οπότε το εργαστήριο που θα πραγματοποιήσει την ανάλυση πρέπει να είναι διαπιστευμένο. Ανεξάρτητα από τον τρόπο ανάλυσης του δείγματος, πρέπει να εξεταστούν και βασικά χαρακτηριστικά ποιότητας προκειμένου η μέθοδος να είναι επικυρωμένη:

- Επιλεκτικότητα (selectivity): η ικανότητα μια αναλυτικής μεθόδου να παρέχει ορθά αποτελέσματα για κάθε ουσία που αναλύεται, ανεξάρτητα από τις υπόλοιπες ουσίες που υπάρχουν στο μίγμα, όπως πχ έκδοχα, εναντιομερή και μεταβολίτες. Η μέτρηση γίνεται με την ανάλυση λευκών δειγμάτων και εσωτερικών προτύπων.
- Γραμμικότητα (linearity): η ικανότητα υπολογισμού άμεσων αποτελεσμάτων, ή με τη χρήση μαθηματικών τύπων ανάλογα με τη συγκέντρωση των προσδιοριζόμενων ουσιών. Η μέτρηση γίνεται με τη πραγματοποίηση τουλάχιστον πέντε επαναλαμβανομένων μετρήσεων.
- Όριο ανίχνευσης (LOD): η χαμηλότερη συγκέντρωση που δίνει απόκριση τουλάχιστον τρεις φορές του μέσου βασικού θορύβου.
- Όριο ποσοτικοποίησης (LOQ): αποτελεί τη χαμηλότερη συγκέντρωση που θα μπορούσε να μετρηθεί με ένα εκατοστιαίο ποσοστό διακύμανσης ακρίβειας και σχετικής μεροληψίας μικρότερης του 20%
- Κατώτερο όριο ανίχνευσης (LLOQ): υπολογίζεται βάσει βιβλιογραφίας και θα πρέπει να είναι χαμηλότερο από τις προτεινόμενα όρια ανίχνευσης (cut-off).
- Σταθερότητα (stability): πρέπει να αξιολογείται σε κάθε βήμα του πειράματος, στην επεξεργασία καθώς και στην αποθήκευση των ουσιών.

- Ανάκτηση (recovery): είναι το ποσοστό της ανάκτησης της αναλυόμενης ουσίας σε σχέση με την απόκριση του πρότυπου διαλύματος. [28]

2.5 Χρόνος έκθεσης σε ουσίες

Ο προσδιορισμός του χρόνου λήψης μιας ουσίας απαιτεί εκτός από την ανάλυση της τρίχας, τη λήψη ιστορικού του ατόμου και ο ρυθμός ανάπτυξης της τρίχας, ο οποίος είναι $1,1 \pm 0,2$ εκατοστά το μήνα, δηλαδή 0.03 εκατοστά τη μέρα. Πρέπει να σημειωθεί ότι ο ρυθμός ανάπτυξης δεν είναι ίδιος για όλα τα άτομα καθώς επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως διατροφή, ορμόνες κ.α. Το σκεπτικό της αναγνώρισης του χρόνου λήψης του φαρμάκου είναι ότι, υπό ιδανικές συνθήκες, η ενσωμάτωση της ουσίας λαμβάνει χώρα μόνο στη ρίζα της τρίχας και η θέση των μορίων της ουσίας στο στέλεχος της τρίχας δεν αλλάζει με την πάροδο του χρόνου. Σύμφωνα με τον Pragst, ο υπολογισμός της ημερομηνίας λήψης του φαρμάκου είναι συνάρτηση της απόστασης του μορίου από τη ρίζα και του ρυθμού ανάπτυξης της τρίχας. Αυτό μπορεί να εκφραστεί με την ακόλουθη εξίσωση:

$$Ti = Ts - Li/Vh - Lr/Vh - To$$

Ti: χρόνος λήψης φαρμάκου

Ts: χρόνος λήψης δείγματος

To: χρόνος μεταξύ της ενσωμάτωσης του φαρμάκου στη ρίζα της τρίχας και της εμφάνισης στην επιφάνεια του δέρματος

Li: απόσταση θέσης του φαρμάκου στη τρίχα από το εγγύς άκρο του δείγματος της τρίχας

Lr: μήκος του υπολειπόμενου στελέχους της τρίχας από το τριχωτό της κεφαλής μετά τη δειγματοληψία.

Vh: μέσος ρυθμός ανάπτυξης τρίχας. [29]

3^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

3.1 Διάρκεια ανίχνευσης κοκαΐνης και μεταβολιτών στα μαλλιά μετά διακοπή της κατάχρησης

Η κοκαΐνη είναι ένα εξαιρετικά εθιστικό ναρκωτικό με ισχυρές διεγερτικές ιδιότητες του κεντρικού νευρικού συστήματος. Σύμφωνα με τα τελευταία στοιχεία, υπολογίζεται ότι υπάρχουν περίπου 18,2 εκατομμύρια χρήστες κοκαΐνης σε όλο τον κόσμο. Η κοκαΐνη υδρολύεται αυθόρμητα και μεταβολίζεται σε βενζοϋλεκγονίνη (BZE). Επιπλέον, αυτό το φάρμακο λαμβάνεται συχνά με αιθανόλη και το προκύπτον προϊόν είναι κοκαϊθυλένιο (CE), που σχηματίζεται μέσω μετεστεροποίησης μετά από ταυτόχρονη λήψη κοκαΐνης και αλκοόλ. Αυτή τη στιγμή, η ανίχνευση της κοκαΐνης και του κύριου μεταβολίτη της BZE είναι η απόδειξη της κατανάλωσης κοκαΐνης. Ο στόχος αυτής της μελέτης είναι να αξιολογήσει τον χρόνο εμφάνισης της κοκαΐνης, του BZE και του CE στα μαλλιά. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε, εφαρμόστηκε σε δείγματα μαλλιών χρηστών κοκαΐνης που ακολουθούσαν πρόγραμμα απεξάρτησης από τα ναρκωτικά βάσει τμηματικής ανάλυσης, προκειμένου να καθοριστεί η συμμόρφωση τους με θεραπεία.

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός έγινε με HP-5MS τριχοειδή στήλη. Η έγχυσή δείγματος όγκου 2μl έγινε χωρίς διαχωρισμό, και το σημείο της έγχυσης είχε θερμανθεί στους 240°C. Ο εκλεκτικός ανιχνευτής μάζας είχε θερμοκρασία 250°C. Ο αναλυτής μάζας λειτουργεί με ιονισμό ηλεκτρονίων (70 eV) σε λειτουργία λήψης επιλεγμένης παρακολούθησης ιόντων (SIM). Για κάθε αναλύμενη ουσία χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα ιόντα: $m/z=182, 303, 198$ (κοκαΐνη), $m/z=185, 306, 201$ (κοκαΐνη-d3), $m/z=240, 82$ (BZE), $m/z=243, 85$ (BZE-d3), $m/z=196, 317, 272$ (CE), $m/z=199, 320$ (CE-d3).

Τα δείγματα μαλλιών για τη παρούσα μελέτη συλλέχθηκαν από μια ομάδα 15 ατόμων ($n=15$). Τα μαλλιά συλλέχθηκαν κάθε 2 μήνες για 6 μήνες από την έναρξη του προγράμματος. Τα δείγματα συλλέχθηκαν με τον ακόλουθο τρόπο: Την ίδια ημέρα της εγγραφής στο πρόγραμμα απεξάρτησης, λήφθηκε το πρώτο δείγμα μαλλιών (δείγμα 0). Αυτό το δείγμα αντιστοιχεί στη χρήση ναρκωτικών πριν την αποχή από τον ασθενή. Στη συνέχεια πάρθηκαν δείγματα τον δεύτερο, τέταρτο και έκτο μήνα. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από την οπίσθια περιοχή της κορυφής όσο το δυνατόν πιο κοντά στο τριχωτό της κεφαλής και υποβλήθηκαν σε μια αρχική διαδικασία καθαρισμού σε 5 ml διαλύματος ουδέτερου σαπουνιού (Tween 20) και στη συνέχεια έκπλυση με απεσταγμένο νερό για να απομακρυνθούν παράγοντες εξωτερικής μόλυνσης. Μετά ακολούθησε στέγνωμα στους 40°C , κόπηκαν σε τμήματα του 1 mm και ζυγίστηκαν σε κλάσματα των 50 mg.

Η ποσοτική ανάλυση μαλλιών για κοκαΐνη, BZE και CE ακολούθησε ένα προηγούμενως δημοσιευμένο επικυρωμένο πρωτόκολλο που περιλαμβάνει εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) με GC/MS. Το έκλουσμα εξατμίστηκε κάτω από ένα ρεύμα αζώτου στους 40°C σε θερμαντική πλάκα. Το υπόλειμμα που ελήφθη μετά την εξάτμιση του εκχυλίσματος, διαλύθηκε σε 40 μL του διαλύματος παραγωγοποίησης BSFTA-TMCS (99:1). Το μίγμα θερμάνθηκε στους 100°C για 20 λεπτά και αμέσως μετά εγχύθηκε στο σύστημα GC/MS.

Η αναλυτική επικύρωση της μεθόδου πραγματοποιήθηκε με τον καθορισμό της γραμμικότητας, των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, προσδιορισμός ακρίβεια και ανάκτησης, σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA. Όσον αφορά τη γραμμικότητα οι συντελεστές συσχέτισης (R^2) ήταν υψηλότεροι από 0,99 για το εύρος συγκέντρωσης που μελετήθηκε. Η ευαισθησία της μεθόδου προσδιορίστηκε με τον υπολογισμό του ορίου ανίχνευσης (LOD) και του ορίου ποσοτικοποίησης (LLOQ). Οι τιμές των παραπάνω φαίνονται στον συγκεντρωτικό πίνακα που ακολουθεί:

Δείγμα	R^2	LOD (ng/mg)	LLOQ (ng/mg)
κοκαΐνη	0,9982	0,015	0,2
BZE	0,9989	0,015	0,2
CE	0,9977	0,025	0,05

Πίνακας 3: Γραμμικότητα, όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης

Η ακρίβεια, εκφρασμένη ως συντελεστής διακύμανσης (CV) των μετρούμενων τιμών, είναι ο λόγος της τυπικής απόκλιση προς το μέσο όρο. Αναμένεται να είναι μικρότερος από 15 % σε όλες τις συγκεντρώσεις, εκτός από LOQ για το οποίο είναι αποδεκτό το 20%. Ενώ το RSD είναι η σχετική τυπική απόκλιση είναι ο λόγος της τυπικής απόκλισης προς την απόλυτη τιμή του μέσου όρου. Και οι δύο τιμές φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Συγκέντρωση ουσίας (ng/mg)	Εντός της ημέρας CV%	Ενδιάμεσα των ημερών CV%	Εντός της ημέρας RSD%	Ενδιάμεσα των ημερών RSD%
KOKAINH				
0,2	8,87	9,10	9,54	9,54
4	6,98	6,51	0,24	1,11
10	4,78	5,02	2,38	2,56
BZE				
0,2	9,84	10,1	5,84	6,2
4	2,22	2,03	0,74	2,35
10	6,85	7,05	9,5	10,91
CE				
0,05	7,44	8,11	12,2	10,4
1	1,63	2,73	7,83	9,1
5	2,52	3,9	6,03	6,85

Πίνακας 4: Συντελεστής διακύμανσης και σχετική τυπική απόκλιση

Το επίπεδο αποκοπής της κοκαΐνης είναι 0,5 ng ανά mg τρίχας και για το BZE και το CE είναι 0,05 ng/mg, όπως υποδεικνύεται από τις οδηγίες του Society of Hair Testing. Σε αυτή την εργασία, έχει επιλεγεί ως LLOQ 0,2 ng/mg (μικρότερο από το αναφερόμενο όριο) για να ποσοτικοποιηθεί με καλύτερη ακρίβεια η φθίνουσα συγκέντρωση κοκαΐνης και BZE. Υπάρχουν λίγες δημοσιεύσεις με ασθενείς που βρίσκονται στη περίοδο απεξάρτησης. Τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας υποδεικνύουν ότι μετά από 4 μήνες αποχής, οι συγκεντρώσεις κοκαΐνης, BZE και CE

στα μαλλιά για ορισμένα άτομα που δοκιμάστηκαν ήταν υψηλότερες από τις τιμές αποκοπής. Μόνο μετά από 6 μήνες αποχής λήφθηκαν αρνητικά αποτελέσματα. [30]

3.2 Προσδιορισμός κανναβινοειδών σε δείγματα νυχιών και μαλλιών

Οι στόχοι της εργασίας ήταν η ανάπτυξη δύο μεθόδων υγρής χρωματογραφίας-διαδοχικής φασματομετρίας μάζας (LC-MS/MS) για τον ποσοτικό προσδιορισμό των κανναβινοειδών σε δείγματα νυχιών και μαλλιών η σύγκριση της ενσωμάτωσης αυτών των αναλυτών σε μαλλιά και νύχια χρηστών κάνναβης προκειμένου να μελετηθεί η βιωσιμότητα δειγμάτων νυχιών ως εναλλακτική λύση για τα μαλλιά.

Συλλέχθηκαν δείγματα μαλλιών και νυχιών από 23 χρήστες σε διάστημα από τον Μάιο του 2016 έως τον Φεβρουάριο του 2019 και καταγράφηκαν στοιχεία όπως φύλο, ηλικία και δείκτη μάζας σώματος. Για λευκά δείγματα χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από το προσωπικό του εργαστηρίου εθελοντικά, προκειμένου να γίνουν οι καμπύλες βαθμονόμησης. Με διαδοχικές αραιώσεις δημιουργήθηκαν διαλύματα βαθμονόμησης σε συγκεντρώσεις 10, 1, 0.5 και 0.04 μg/mL με πρότυπο διάλυμα μεθανόλης. Για τον ποιοτικό έλεγχο παρασκευάστηκαν διαφορετικά διαλύματα με μεθανόλη: κανναβινόλη (CBN) και Δ9-τετραϋδροκανναβινόλης (THC) σε συγκεντρώσεις 10, 1 και 0.02 μg/mL, κανναβιδιόλη (CBD), 11-νορ-9-καρβοξύ-THC (THCCOOH) και 11-υδροξύ-THC (OHTHC) σε συγκεντρώσεις 10, 1 και 0.2 μg/mL. Το εσωτερικού προτύπου (IStd) περιείχε όλους τους δευτεριωμένους αναλύτες σε 1 μg/mL με MeOH.

Τα δείγματα τριχών και νυχιών απολυμάνθηκαν με 3 και 5 διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα διχλωρομεθανίου των 2 mL. Μετά την ψύξη, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE), χρησιμοποιώντας δοχεία που είχαν προηγουμένως είχαν ρυθμιστεί με 2 mL μεθανόλης και 2 mL νερό. Μετά την εισαγωγή του δείγματος, εφαρμόστηκαν τέσσερα στάδια έκπλυσης με 2 mL μυρμηκικό οξύ 5% σε νερό, 2 mL νερό, 2 mL NH₄OH 5% σε νερό και 2 mL MeOH:νερό (60:40, v/v). Η έκλουση πραγματοποιήθηκε με προσθήκη διαλύματος μεθανόλης μυρμηκικού οξέος. Τα εκλούσματα εξατμίστηκαν με άζωτο στους 35°C και τα δείγματα νυχιών ανασυστάθηκαν σε 75 μL μυρμηκικού οξέος 0,1% σε νερό:ακετονιτρίλιο (60:40, v/v). Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας αναλυτική στήλη Kinetex C18 (2,1 mm x 50 mm, 2,6 μm), στους 25°C, με κινητή φάση μυρμηκικό οξύ 0,1% και ακετονιτρίλιο στα 0,3 mL/min, για δέκα λεπτά. Τέλος,

πραγματοποιήθηκε φασματομετρική ανάλυση μάζας σε λειτουργία θετικού ιόντος, για ταυτοποίηση των αναλυόμενων ουσιών.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης, υπολογίστηκε ότι το LOQ είναι 20 pg/mg για CBN και THC στα νύχια, ενώ στα μαλλιά είναι 40 pg/mg, για τους υπόλοιπους αναλυτές και στους δύο τύπους των δειγμάτων είναι 100 pg/mg. Το LOD σε δείγμα νυχιών είναι 10 pg/mg για THC, 20 pg/mg για CBN, 50 pg/mg για THCCOOH και για τα υπόλοιπα 100 pg/mg, ενώ σε δείγμα μαλλιών για όλες τις ουσίες είναι 40 pg/mg, εκτός από diOHTHC που είναι 100 pg/mg. Η ακρίβεια για τις ουσίες που ανιχνεύθηκαν στα νύχια είναι 99.5-109.1% και για τις τρίχες 101.0-109.8%.

Αναπτύχθηκαν και επικυρώθηκαν δύο μέθοδοι LC-MS/MS για τον προσδιορισμό έξι κανναβινοειδών σε νύχια και μαλλιά, και εφαρμόστηκαν σε δείγματα ταιριασμένων νυχιών και μαλλιών από 23 χρόνιους χρήστες κάνναβης. Τα νύχια των χεριών είχαν υψηλότερες συγκεντρώσεις από τα μαλλιά και οι συγκεντρώσεις CBN και THC στα μαλλιά συσχετίστηκαν καλύτερα με τα νύχια των ποδιών παρά με τις συγκεντρώσεις των νυχιών των χεριών, που είναι πιο ευαίσθητα σε εξωτερική μόλυνση. Συνοπτικά, τα νύχια είναι μια χρήσιμη εναλλακτική απάντηση στις τρίχες για την ανίχνευση της μακροχρόνιας κατανάλωσης κάνναβης. [31]

3.3 Ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση αμφεταμινών και οπιούχων σε ανθρώπινα μαλλιά με LC-MS

Σ' αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές για τη ταυτόχρονη ανάλυση αμφεταμίνης (AP), μεθαμφεταμίνης (MA), μορφίνης (MOR), κωδεΐνης (COD), 6-ακετυλομορφίνης (6-AM) και 6-ακετυλοκωδεΐνης (6-AC) στα μαλλιά. Αρχικά, κόπηκαν δείγματα βάρους 75 mg το καθένα, τα οποία στη συνέχεια κόπηκαν λιγότερο από 1 mm. Ακολούθησε απολύμανση με διχλωρομεθάνιο. Ο διαλύτης στη συνέχεια εξατμίστηκε στους 50°C, υπό ρεύμα αζώτου. Τα δείγματα κατεργάστηκαν με υπερήχους και με διαλύματα επώασης/πέψης μεθανόλης- τριφθοροξικού οξέος.

Το ξηρό υπόλειμμα που προκύπτει ρυθμίζεται σε pH 6,0 με 3 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού 0,1 M. Οι στήλες της εκχύλισης στερεάς φάσης ρυθμίστηκαν προσθέτοντας διαδοχικά 1 mL μεθανόλης, 1 mL απιονισμένου νερού και 1 mL ρυθμιστικού φωσφορικού (pH 6,0). Το διάλυμα εισάγεται στη στήλη και ρέει για

τουλάχιστον δύο λεπτά. Η αναλυόμενη ουσία εκλούστηκε με 2 mL μίγματος οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και υδροξειδίου του αμμωνίου (73:25:2, v/v/v). Τα προκύπτοντα εκχυλίσματα ξηράθηκαν υπό ρεύμα αζώτου στους 50°C. Το ξηρό υπόλειμμα στη συνέχεια ανασυστάθηκε με 100 mL του αρχικού διαλύτη της κινητής φάσης (νερό με 0,1% μυρμηκικό οξύ/μεθανόλη ¼ 90:10, v/v) για έγχυση σε LC.

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας αναλυτική στήλη (2.1 mm 100 mm, 1.8 mm particle), που λειτουργούσε σε 50°C. Η κινητή φάση αποτελούνταν από 0,1% μυρμηκικό οξύ (ο/ο) σε νερό (Α) και μεθανόλη (Β) με ρυθμό ροής 0,32 mL/min. Τέλος, πραγματοποιήθηκε φασματομετρική ανάλυση μάζας σε λειτουργία θετικού ιόντος και εφαρμόστηκε παρακολούθηση πολλαπλών αντιδράσεων (MRM) για ταυτοποίηση. Ακολουθεί πίνακας με τις παραμέτρους επικύρωσης της μεθόδου.

Ουσία	γραμμικότητα	LOD (pg/mg)	LOQ(pg/mg)	Ανάκτηση
AP	0,9994	2	10	62,8 ± 5,6
MA	0,9996	2	10	66,3 ± 1,8
MORE	0,9996	8	10	55,5 ± 1,8
COD	0,9998	8	10	73,9 ± 0,7
6-AM	0,9995	8	10	64,1 ± 0,9
6-AC	0,9987	8	10	74,6 ± 1,4

Πίνακας 5: Παράμετροι επικύρωσης και δεδομένα βαθμονόμησης

Ο συντελεστής διακύμανσης και η ακρίβεια εντός της ημέρας έχουν εύρος 1,6-7,6% και 6,0-12,8%, ενώ ενδιάμεσα των ημερών 1,3-6,6% και 6,9-9,3%, αντίστοιχα. Όλα τα δεδομένα είναι εντός των αποδεκτών τιμών.

Το επίπεδο συγκέντρωσης ενός φαρμάκου και το μοτίβο διανομής του σε διάφορα τμήματα μιας τρίχας μπορεί να αντικατοπτρίζει αν ο δότης του δείγματος είναι χρήστης ναρκωτικών ή και ακόμα να αποκαλύψει το ιστορικό χρήσης ναρκωτικών. Ωστόσο, δεν μπορεί να επιτευχθεί αξιόπιστη ερμηνεία χωρίς σημαντική συσσώρευση δεδομένων που προέρχονται από την ανάλυση δειγμάτων μαλλιών αλλά και από τη λήψη ιστορικού του δότη. Σημαντικό είναι να σημειωθεί πως το ίδιο εργαστήριο για

την ίδια ανάλυση χρησιμοποιούσε GC, για τη ταυτόχρονη ανάλυση των παραπάνω ουσιών. Η LC-MS πλεονεκτεί γιατί δεν απαιτείται το στάδιο παραγωγοποίησης, επιτυγχάνει χαμηλότερα LOD και LOQ και επίσης μέσω αυτής της μεθόδου μπορεί να πραγματοποιηθεί ταυτόχρονη ανάλυση στις ουσίες και στους μεταβολίτες τους. [32]

3.4 Γρήγορος και εξαιρετικά ευαίσθητος προσδιορισμός των μεταβολιτών της τετραϋδροκανναβινόλης (THC) στα μαλλιά χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας πολλαπλών σταδίων (LC-MS³)

Σύμφωνα με πρόσφατα στοιχεία που δημοσιεύθηκαν από το Γραφείο των Ηνωμένων Εθνών για τα Ναρκωτικά και το Έγκλημα (UNODC), η κάνναβη παραμένει μακράν το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο ναρκωτικό, με περίπου 192 εκατομμύρια καταναλωτές παγκοσμίως. Το πιο σημαντικό ψυχοδραστικό φυσικό συστατικό της *Cannabis sativa*, η τετραϋδροκανναβινόλη (THC), υφίσταται ηπατικό μεταβολισμό που βασίζεται στην οξείδωση και την επακόλουθη γλυκουρονιδίωση. Οι οξειδωτικά σχηματιζόμενοι μεταβολίτες ανιχνεύονται συχνά σε βιολογικές δείγματα, με διαγνωστική σημασία στην εγκληματολογική τοξικολογία (αίμα, ούρα και τρίχες). Η ανάλυση τρίχας παρέχει ένα πολύτιμο συμπληρωματικό εργαλείο για τις συμβατικές μήτρες λόγω της δυνατότητας μακροχρόνιας αναδρομικής ανίχνευσης, λιγότερο επεμβατικής συλλογής δειγμάτων και μεγαλύτερης σταθερότητας δείγματος σε σύγκριση με τα σωματικά υγρά, δηλαδή το αίμα και τα ούρα. Ωστόσο, τα βιολογικά κανναβινοειδή αποτελούν μια ειδική αναλυτική πρόκληση για την ανάλυση μαλλιών για διάφορους λόγους. Μόνο η ανίχνευση μεταβολιτών παρέχει μια ξεκάθαρη επιβεβαίωση της κατάχρησης κάνναβης, καθώς η THC και το Δ9-τετραϋδροκανναβινολικό οξύ A (THCA-A) μπορούν επίσης να προέρχονται από εξωτερικές μολύνσεις, όπως η προσρόφηση καπνού ή διασταυρούμενη μόλυνση μέσω επαφής με το χέρι. Ωστόσο, ο πρωτεύων μεταβολίτης THC-COOH έχει χαμηλό ρυθμό ενσωμάτωσης στη μήτρα της τρίχας λόγω της όξινης φύσης του. Ο μεταβολίτης 11-OH-THC συνιστάται ως περαιτέρω κατάλληλος δείκτης για την απόδειξη της ενεργού χρήσης κάνναβης.

Ο στόχος αυτής της εργασίας ήταν να καθιερωθεί μια γρήγορη και απλοποιημένη μέθοδος LC-MS, για τον ευαίσθητο και ποσοτικό προσδιορισμό των THC-COOH και 11-OH-THC σε δείγματα μαλλιών. Ένας κατάλληλος συνδυασμός επεξεργασίας μαλλιών και ενόργανης ανάλυσης είναι ζωτικής σημασίας για την ανίχνευση ιχνοποσοτήτων THC-COOH. Επομένως, διαφορετικές τεχνικές προετοιμασίας δειγμάτων, συμπεριλαμβανομένης της SPE και της εκχύλισης υγρού-υγρού (LLE) μετά από αλκαλική χώνευση δειγμάτων μαλλιών, καθώς και δύο διαφορετικές προσεγγίσεις ανάλυσης (φασματομετρία μάζας δύο ή τριών σταδίων, MS², MS³) συγκρίθηκαν για

την επίτευξη αυτού του στόχου. Τέλος, η μέθοδος που αναπτύχθηκε χρησιμοποιώντας βελτιστοποιημένες συνθήκες προετοιμασίας δειγμάτων και ενόργανης ανάλυσης, επικυρώθηκε πλήρως και εφαρμόστηκε σε αυθεντικά δείγματα μαλλιών από χρήστες κάνναβης.

Μετά τη συλλογή των δειγμάτων, οι τρίχες υποβλήθηκαν σε εξωτερική απολύμανση με διαδοχικό πλύσιμο με ισοεξάνιο και ακετόνη και λουτρό υπερήχων σε κάθε βήμα. Μετά τη ξήρανση, τα δείγματα κόπηκαν σε μικρά κομμάτια μήκους 1mm και ζυγίστηκαν (20mg).

Ποιοτικοί έλεγχοι και καμπύλες βαθμονόμησης πραγματοποιήθηκαν με δείγματα (πρότυπα) που λήφθηκαν από εθελοντές και εμπλουτίστηκαν με γνωστές συγκεντρώσεις THC-COOH. Η προετοιμασία του δείγματος μαλλιών πριν από την ανίχνευση των THC-COOH και 11-OH-THC βασίστηκε στην πέψη της μήτρας των μαλλιών, υπό αλκαλικές συνθήκες, ακολουθούμενη από μια διαδικασία εκχύλισης.

Δύο διαφορετικές διαδικασίες εκχύλισης συγκρίθηκαν για τον κύριο μεταβολίτη, THC-COOH, όπως περιγράφεται παρακάτω. Το δείγμα μαλλιών (20mg) μαζί με μεθανόλη (0,5 ml) και το εσωτερικό πρότυπο υποβλήθηκε σε πέψη χρησιμοποιώντας το διάλυμα υδροξειδίου του καλίου (10 M, 0,4 ml) στους 80°C για 30 λεπτά. Το pH στη συνέχεια ρυθμίστηκε σε 5-6 με προσθήκη παγόμορφου οξικού οξέος (0,5 ml) και στη συνέχεια, προστέθηκε μίγμα οξικού νατρίου/μεθανόλης. Μέσω της εκχύλισης στερεάς φάσης πραγματοποιείται ο καθαρισμός του δείγματος. Η ακόλουθη διαδικασία αντιπροσωπεύει βελτιστοποιημένες συνθήκες για εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE) 11-OH-THC και THC-COOH. Η αλκαλική πέψη του δείγματος έλαβε χώρα μετά την προσθήκη υδροξειδίου του νατρίου και μεθανόλης παρουσία εσωτερικού προτύπου στους 80°C για 1 ώρα. Από τις δύο μεθόδους εκχύλισης, επιλέχθηκε η LLE γιατί απαιτεί λιγότερο χρόνο, είναι αποτελεσματικότερη στην απομάκρυνση προσμίξεων και είναι λιγότερο περίπλοκη.

Η ανάλυση των δειγμάτων μαλλιών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ένα σύστημα LC-MS που αποτελείται από ένα εξαιρετικά υψηλής απόδοσης LC (UHPLC), εξοπλισμένο με απαερωτή, δυαδικές αντλίες LC-30AD, αυτόματο δειγματολήπτη και φασματομέτρο μάζας. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός διεξήχθη σε αναλυτική στήλη (100 × 2,1 mm, μέγεθος σωματιδίων 1,7 μm, διάμετρος πόρων 100 Å). Η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 40°C και η θερμοκρασία του αυτόματου δειγματολήπτη

διατηρήθηκε στους 10°C. Ο όγκος ένεσης ορίστηκε στα 20 μl. Επίσης, η κινητή φάση περιελάμβανε υπερκαθαρό νερό και μεθανόλη που χορηγήθηκαν με 0,5 ml/min σε βαθμιδωτή λειτουργία έκλουσης.

Η φασματομετρία μάζας περιελάμβανε λειτουργία λήψης παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων (MRM) χρησιμοποιώντας ηλεκτροψεκασμό που λειτουργεί σε αρνητική λειτουργία (ESI-) στα -4500 V, δίνοντας θραύσματα για ταυτοποίηση των ουσιών. Η ανάλυση MS² περιελάμβανε την ανίχνευση ιόντων θραύσματος πρώτου σταδίου για THC-COOH (m/z 343,1 → 299,2 και m/z 343,1 → 245,2) και THC-COOH D9 (m/z 352,2 → 2,2 308,5 και m/z 352,2 → 308,5). Η ανάλυση MS³ πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη γραμμική παγίδα ιόντων (LIT) για την εισαγωγή του δεύτερου σταδίου κατακερματισμού.

Στην παρούσα εργασία, συγκρίθηκαν δύο διαφορετικές διεργασίες εκχύλισης για τη επεξεργασία των δειγμάτων, καθώς και δύο διαφορετικές εφαρμογές ανάλυσης (MS², MS³) προκειμένου να αναπτυχθεί μια γρήγορη και ευαίσθητη μέθοδος για τον προσδιορισμό των κύριων μεταβολιτών της κάνναβης. Η εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE) αποδείχτηκε ικανοποιητική για την επικύρωση της μεθόδου και η φαρματομερία μάζας MS³ έδειξε μεγάλα πλεονεκτήματα όσον αφορά την ευαισθησία και την επιλεκτικότητα της μεθόδου. Δεδομένων των περιγραφόμενων συνθηκών, η μέθοδος που παρουσιάστηκε επέτρεψε την ανίχνευση THC-COOH με LOQ 0,1 pg/mg χρησιμοποιώντας μόνο μια μικρή ποσότητα (20 mg) δείγματος μαλλιών. Τα παραπάνω δεδομένα καθώς και η επιτυχής εφαρμογή σε 2225 αυθεντικά δείγματα τοξικολογικών περιπτώσεων έδειξαν πως η συγκεκριμένη μέθοδος είναι κατάλληλη για ανάλυση τριχών σε χρήστες κάνναβης και μπορεί να αντικαταστήσει τη χρονοβόρα GC-MS/MS. Οι μέθοδοι που βασίζονται στην υγρή χρωματογραφία αποκτούν συνεχώς εφαρμογή σε τοξικολογικές έρευνες. Η LC-MS³ αποτελεί μέθοδο με σημαντικά πλεονεκτήματα στην ευαισθησία, επιλεκτικότητα και ακρίβεια της ανάλυσης. [33]

3.5 Ταυτόχρονος προσδιορισμός αιθυλογλυκουρονιδίου, κοκαΐνης, κοκαϊθυλενίου και βενζοϋλεκγονίνης στα μαλλιά με χρήση LC-MS/MS

Το αλκοόλ και η κοκαΐνη (COC) πολύ συχνά χρησιμοποιούνται μαζί έχοντας πολύ βλαβερές συνέπειες, τόσο για τον χρήστη όσο και για τη δημόσια ασφάλεια, αφού η χρήση των δύο παραπάνω έχει συνδεθεί πολλές φορές με ατυχήματα ή εγκλήματα. Η

κατάχρηση αλκοόλ και κοκαΐνης (COC) διαταράσσει το κεντρικό νευρικό σύστημα, οδηγώντας σε εθισμό και ασθένειες, καθώς και ποινικά αδικήματα όπως οδήγηση υπό την επήρεια μέθης, βία, σεξουαλική βία, ληστεία και δολοφονίες. Πολλές χώρες, συμπεριλαμβανομένης και της Ν. Κορέας προσπαθούν να αποτρέψουν τέτοιου είδους εγκλήματα, ελέγχοντας τη διανομή και τη χρήση παράνομων ναρκωτικών.

Η επίδραση των ναρκωτικών μπορεί να αυξηθεί με τη κατανάλωση αλκοόλ. Το 50-90% των χρηστών COC καταναλώνουν ταυτόχρονα και αλκοόλ. Σύμφωνα με μελέτες που αναλύουν το επίπεδο επιθετικότητας σε άτομα με εξάρτηση από αλκοόλ και COC, το επίπεδο επιθετικότητας είναι υψηλότερο σε όσους χρησιμοποιούν ταυτόχρονα τις δύο ουσίες από ό,τι σε εκείνους που χρησιμοποιούν μία μόνο. Επίσης, και ο κίνδυνος αυτοκτονικού ιδεασμού είναι επίσης υψηλότερος σε χρήστες και των δύο ουσιών. Επιπλέον, αξιοσημείωτα επίπεδα μεταβολιτών αλκοόλης και COC έχουν ανιχνευθεί στα αποτελέσματα τοξικολογικών εξετάσεων σε οδηγούς που έχουν προκαλέσει θανατηφόρα τροχαία ατυχήματα. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η συνδυασμένη χρήση αλκοόλ και COC μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχές ελέγχου των παρορμήσεων και να αυξήσει την πιθανότητα εγκληματικής συμπεριφοράς και ατυχημάτων.

Στην παρούσα εργασία, αναπτύχθηκε φασματομετρική μέθοδος μάζας διαδοχικής χρωματογραφίας υγρής χρωματογραφίας για την ταυτόχρονη ανάλυση του αιθυλογλυκουρονιδίου (EtG), ενός μεταβολίτη της αιθανόλης, του κοκααιθυλενίου (CE), μεταβολίτη της COC που προέρχεται από αλκοόλη και βενζοϋλεκγονίνης (BZE), κύριου μεταβολίτη της COC, για τον προσδιορισμό της ταυτόχρονης χρήσης αλκοόλ με COC. Σε αυτή τη μελέτη, αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μια αναλυτική μέθοδος βασισμένη στο LC-MS/MS για την ταυτόχρονη ανάλυση EtG, COC, CE και BZE στα μαλλιά. Η νέα μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ιατροδικαστική για την ανίχνευση EtG και CE στα μαλλιά, για τον προσδιορισμό της ανεξάρτητης χρήσης COC καθώς και της συνδυασμένης χρήσης COC και αλκοόλ και για την παροχή συγκεκριμένων περιστασιακών αποδεικτικών στοιχείων για ποινικές υποθέσεις.

Δείγματα μαλλιών από χρήστες μπορούν να δείξουν τη ταυτόχρονη χρήση αλκοόλ και κοκαΐνης ακόμα και αν η χρήση έχει γίνει ένα χρόνο πριν. Σε αντίθεση, δείγματα ούρων και αίματος δείχνουν πρόσφατη χρήση. Η ανίχνευση CE σε τρίχες ατόμου δείχνει τη ταυτόχρονη χρήση κοκαΐνης και αλκοόλ και η συγκέντρωση EtG στα μαλλιά επιτρέπει ταυτόχρονα τον προσδιορισμό του επιπέδου κατανάλωσης αλκοόλ.

Συλλέχθηκαν δείγματα μαλλιών, έγινε έκπλυση δύο φορές με διχλωρομεθάνιο και νερό, κονιοποιήθηκαν και στη συνέχεια ξηράθηκαν. Για την προεπεξεργασία, χρησιμοποιήθηκαν υπερφυγοκέντρωση (5 λεπτά, 50.000 g) και μεικτής λειτουργίας εκχύλιση στερεάς φάσης ανταλλαγής ανιόντων (MAX, mixed-mode anion exchange) για να αυξηθεί η ανάκτηση των στοχευμένων ενώσεων και να ελαχιστοποιηθεί η επίδραση της μήτρας των μαλλιών. Το έκλουσμα μετά τις δύο εκχυλίσεις, ξηράθηκε σε ρεύμα αζώτου στους 40°C για 25 λεπτά. Το τελικό υπόλειμμα δείγματος διαλύθηκε σε 0,1% οξικό οξύ και ακετονιτρίλιο σε αναλογία 95:5 (v/v) και 8 μ L από το διάλυμα εγχύθηκαν σε LC-MS/MS.

Ως κινητή φάση A και κινητή φάση B χρησιμοποιήθηκαν 0,1% οξικό οξύ (νερό με 0,1% (o/o) οξικό οξύ) και ακετονιτρίλιο, αντίστοιχα. Η θερμοκρασία στήλης στο σύστημα LC και η θερμοκρασία αποθήκευσης του δείγματος στον αυτόματο δειγματολήπτη διατηρήθηκαν στους 40°C και 4°C, αντίστοιχα. Η συνθήκη έκλουσης βαθμίδωσης εφαρμόστηκε με τον ρυθμό ροής της κινητής φάσης να διατηρείται στα 220 μ L/min. Χρησιμοποιώντας τον γρήγορο χρόνο μεταγωγής πολικότητας θετικού-αρνητικού ιόντος των 5 ms, μια μέθοδος που εφαρμόζει ταυτόχρονα τον αρνητικό τρόπο για την ανάλυση EtG και τον θετικό τρόπο για την ανάλυση COC, CE και BZE, πραγματοποιήθηκε ιονισμός ηλεκτροψεκασμού. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των στοχευόμενων ενώσεων στα μαλλιά, εφαρμόστηκε η μέθοδος παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων (MRM).

Η αναλυτική επικύρωση της μεθόδου πραγματοποιήθηκε με τον καθορισμό της γραμμικότητας, των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, οι τιμές των οποίων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Ουσία	LOD (pg/mg)	LLOQ (pg/mg)	r
EtG	2	7	0,9978
COC	0,5	2	0,9989
CE	2	10	0,9987
BZE	0,3	1	0,9989

Πίνακας 6: Παράμετροι επικύρωσης

Αξίζει να σημειωθεί, πως για τη μεγιστοποίηση της αποτελεσματικότητας της μεθόδου, επιλέχθηκε το οξικό οξύ και το ακετονιτρίλιο ως κινητή φάση για να επιτευχθεί μεγαλύτερη ευαισθησία για το EtG, από τις υπόλοιπες ενώσεις. Τέλος, η μέθοδος που αναπτύχθηκε σε αυτή τη μελέτη αποδείχθηκε ότι επιτρέπει γρήγορες και ταυτόχρονες αναλύσεις χωρίς παρεμβαλλόμενες ενώσεις όταν εφαρμόζεται στο δείγμα μαλλιών από άτομο που χρησιμοποιούσε ταυτόχρονα COC και αλκοόλ. [34]

3.6 Ανάπτυξη μεθόδου UPLC–MS/MS για ανάλυση 16 συνθετικών οπιοειδών σε μαλλιά και αξιολόγηση ιστορικού σε χρήστες φαιντανύλης

Η φαιντανύλη χρησιμοποιείται κλινικά για τη διαχείριση του πόνου, αλλά η κατάχρηση της μπορεί να προκαλέσει αρκετές ανεπιθύμητες παρενέργειες όπως είναι η βραδυκαρδία, αναπνευστική καταστολή, μειωμένη συνείδηση και κόμα. Η δραστηριότητα της φαιντανύλης είναι περίπου 50 φορές μεγαλύτερη από τη μορφίνη, με ανάλογα όπως η καρφεντανίλη περίπου 10.000 φορές πιο ισχυρή από τη μορφίνη, επομένως απαιτείται η ανάγκη για υψηλή ευαισθησία κατά την ανάλυση. Από τη 2004 έως το 2018 υπήρξαν αυξήσεις στις ανεπιθύμητες ενέργειες φαρμάκων που περιλαμβάνουν κατάχρηση φαιντανύλης, με το 34 % των περιπτώσεων να καταλήγουν σε μακροχρόνια νοσηλεία και το 33 % στον θάνατο.

Στις Ηνωμένες Πολιτείες, το 68 % των θανάτων από υπερβολική δόση ναρκωτικών αφορούσε οπιοειδή. Σημειώθηκε αύξηση της τάξεως του 45 % στους θανάτους που

σχετίζονται με συνθετικά οπιοειδή μεταξύ 2016 και 2017. Ως εκ τούτου, ο προσδιορισμός της πολλαπλής χρήσης ναρκωτικών σε αυτόν τον πληθυσμό μαζί με τα συνθετικά οπιοειδή γίνεται ουσιαστικός στα τοξικολογικά εργαστήρια.

Η προετοιμασία των δειγμάτων για τα δείγματα μαλλιών περιλάμβανε αρχικά, συλλογή και απολύμανση με διχλωρομεθάνιο και μεθανόλη ως οργανικούς διαλύτες και νερό ως υδατικό μέσο για 2 λεπτά χωρίς υπερήχους σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, τα δείγματα στέγνωσαν και κόπηκαν σε τμήματα 1 cm. Περίπου 20 mg τοποθετήθηκαν σε σωληνάριο Precellys των 2 mL, που περιείχε έξι σφαιρίδια από ανοξείδωτο χάλυβα και ακολούθησε κονιοποίηση. Μετά την προσθήκη 25 mL πρότυπου διαλύματος, τα δείγματα επώαστηκαν με 1 mL μεθανόλης για 4 ώρες σε υδατόλουτρο στους 45°C, υπό υπερήχους. Τα δείγματα στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν σε 14.000 rpm για 10 λεπτά και τα υπερκείμενα μεταφέρθηκαν σε σωλίνες και συμπυκνώθηκαν υπό κενό. Η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) ολοκληρώθηκε για όλα τα δείγματα χρησιμοποιώντας σωλίνες, οι οποίοι ρυθμίστηκαν διαδοχικά με 1 mL μεθανόλη, 1 mL απεσταγμένο νερό και 1 mL ρυθμιστικό διάλυμα οξικού 2 M.M. Η έκλουση ολοκληρώθηκε με 1 mL μεθανόλης και αμμωνία (95:5 v/v). Τα δείγματα στη συνέχεια ξηράνθηκαν και ανασυστάθηκαν σε 300 µl.

Ο διαχωρισμός ολοκληρώθηκε χρησιμοποιώντας στήλη φαινυλίου Acquity UPLC BEH (2,1 100 mm, 1,7 mm). Η θερμοκρασία της στήλης ήταν 50°C και ο ρυθμός ροής ήταν 0,55 mL/min. Η κινητή φάση Α αποτελούνταν από 0,1 % μυρμηκικό οξύ σε νερό και η κινητή φάση Β αποτελούνταν από μεθανόλη με 0,1 % μυρμηκικό οξύ.

Η διαδικασία επικύρωσης πραγματοποιήθηκε με κριτήρια αποδοχής, βάσει της βιβλιογραφίας και των διεθνών κατευθυντήριων γραμμών. Τα αποτελέσματα της επικύρωσης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Οι καμπύλες βαθμονόμησης δημιουργήθηκαν με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων με γραμμική ή τετραγωνική παλινδρόμηση. Η απόκλιση ήταν μικρότερη του 20% από τις ονομαστικές συγκεντρώσεις και το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης (LLOQ) αξιολογήθηκε στο 140% του χαμηλότερου βαθμονομητή.

ΟΥΣΙΑ	Rt (min)	Range (pg/mg)	Regression
Norfentanyl	1,1	1-200	τετραγωνική
Methoxyacetylfentanyl	2,2	0,5-200	τετραγωνική
Acetylfentanyl	2,3	0,5-250	τετραγωνική
Ocfentanyl	2,4	0,5-200	τετραγωνική
Tetrahydrofuranylfentanyl	3,5	0,5-500	τετραγωνική
Acrylfentanyl	3,7	1-500	τετραγωνική
U-47700	3,9	1-500	γραμμική
Fentanyl	4,0	0,5-500	τετραγωνική
Alfentanyl	4,1	0,5-500	γραμμική
AH-7921	4,6	1-500	γραμμική
U-49900	4,7	0,5-500	γραμμική
Furanylfentanyl	4,9	0,5-500	τετραγωνική
Crotonylfentanyl	5,5	1-500	γραμμική
Butyrylfentanyl	5,8	0,5-200	τετραγωνική
4-Fluoro-iso-butyryl fentanyl	5,8	0,5-500	τετραγωνική
Valerylfentanyl	6,0	0,15-50	γραμμική

Πίνακας 7 : Γραμμικότητα, εύρη βαθμονόμησης και παράμετροι γραμμικότητας για κάθε ένωση

Τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά με $RSD < 15\%$ για όλες τις ενώσεις εκτός από το νορφεντανύλιο (22%) και το αλφεντανύλιο (19%), το οποίο για την ανάλυση μαλλιών θεωρήθηκε αποδεκτό. Επίσης, πειράματα σταθερότητας επεξεργασμένου δείγματος έδειξαν ότι όλα οι ενώσεις ήταν σταθερές για τουλάχιστον δύο ημέρες στον αυτόματο δειγματολήπτη.

Κατά τη στιγμή της ανάπτυξης της μεθόδου (τέλος του 2018), υπήρχαν πολύ περιορισμένες πληροφορίες σχετικά με τη χρήση συνθετικών οπιοειδών στο Βέλγιο. Επομένως, η επιλογή των συγκεκριμένων ενώσεων ήταν ένας συμβιβασμός μεταξύ του διαθέσιμου προϋπολογισμού, των συνθετικών οπιοειδών που είναι ήδη διαθέσιμα στο εργαστήριο και της αναζήτησης στη βιβλιογραφία. Αρχικά επιλέχθηκαν 23 ενώσεις, μόνο οι 16 απ' τις οποίες μπορούσαν να ικανοποιήσουν τα κριτήρια επικύρωσης και μόνο αυτά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εργασία. Η αποτελεσματικότητα της

εκχύλισης από τα δείγματα μαλλιών μπορεί να αξιολογηθεί με αυθεντικά δείγματα από χρήστες συνθετικών οπιοειδών, με διαφορετικούς διαλύτες σε διαφορετικά χρονικά σημεία. Δυστυχώς υπήρχαν αρκετά αυθεντικά δείγματα για να πραγματοποιηθούν τέτοια πειράματα. Ωστόσο, η εκχύλιση από κονιοποιημένα μαλλιά σε μεθανόλη για 4 ώρες υπό υπερήχους στους 45°C είναι μια αρκετά κοινή μέθοδος για την εξαγωγή βασικών φαρμάκων από τα μαλλιά. Ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων ελήφθη στα αυθεντικά δείγματα μαλλιών και οι συγγραφείς υποθέτουν ότι η διαδικασία εκχύλισης ήταν κατάλληλη για την εξαγωγή συνθετικών οπιοειδών από τα μαλλιά.

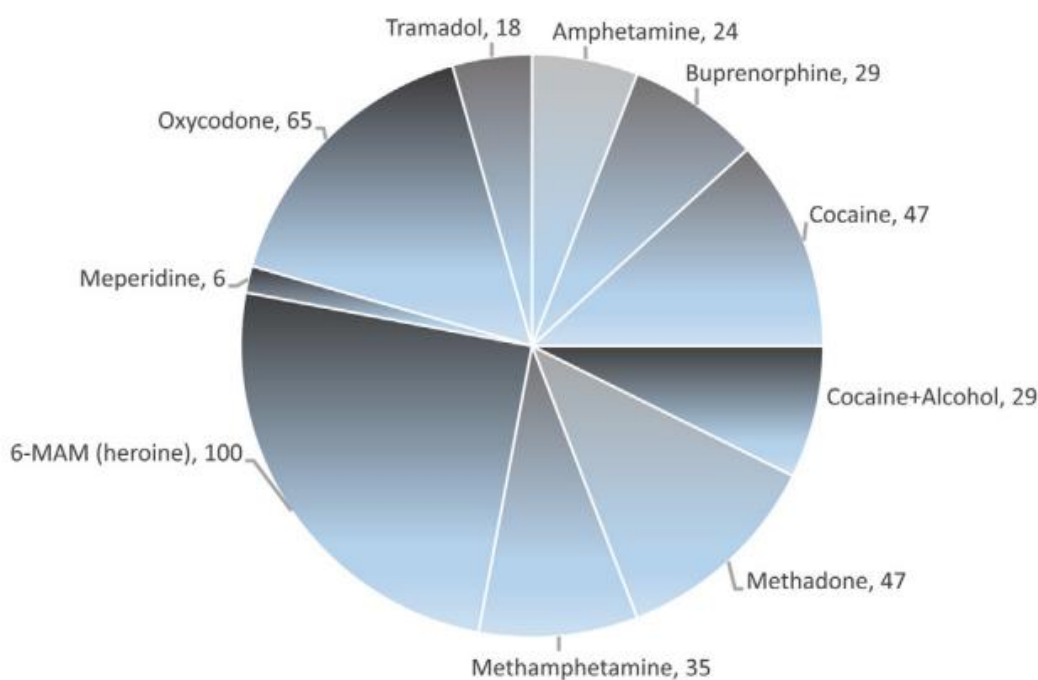
Κατά τη διάρκεια της παρούσας επικύρωσης της μεθόδου, η χρωματογραφία βελτιστοποιήθηκε για να βελτιώσει τον διαχωρισμό των ενώσεων. Ωστόσο, η κροτονυλοφαιτανύλη και η κυκλοπροπυλοφαιτανύλη δεν μπορούσαν τελικά να διαχωριστούν επειδή έχουν τον ίδιο χρόνο έκλουσης. Για το λόγο αυτό, η κροτονυλοφαιτανύλη επιλέχθηκε μόνο για τα πειράματα επικύρωσης. Έτσι, σε περίπτωση θετικού αυθεντικού δείγματος μαλλιών κροτονυλοφαιτανύλης, και οι δύο ενώσεις πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν.

Στα αποτελέσματα της εργασίας, οι ενώσεις που ανιχνεύθηκαν σε 17 διαφορετικά δείγματα τριχών σε χώρους εγασίας στις ΗΠΑ, περιελάμβαναν φαιτανύλη ($n=16$), νορ-φεντανύλη ($n=15$), ακετυλ-φαιτανύλη ($n=5$), βαλερυφαιτανύλη ($n = 1$), φουρανυλοφαιτανύλη ($n = 5$) και τετραϋδροφουρανυλοφαιτανύλη ($n = 1$). Ως εκ τούτου, η φαιτανύλη και ο κύριος μεταβολίτης της, νορ-φαιτανύλη, ήταν οι ουσίες που ανιχνεύθηκαν περισσότερο στα μαλλιά, ακολουθούμενες από την ακετυλοφαιτανύλη και τη φουρανυλοφαιτανύλη. Η αναλογία μητρικού φαρμάκου / μεταβολίτη (φαιτανύλη / νορ-φαιτανύλη) διέφερε μεταξύ των ατόμων, έτσι βρέθηκαν έως και 55 φορές υψηλότερες συγκεντρώσεις φαιτανύλης από ό, τι νορ-φαιτανύλης.

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν περιορισμένες μέθοδοι LC-MS/MS για την ανάλυση αναλόγων της φαιτανύλης στα μαλλιά. Οι Busardò et al. , ανέλυσαν και ποσοτικοποίησαν τα 22 ανάλογα φαιτανύλης. Η ακρίβεια και η μεροληψία ήταν μικρότερες από 15 %, και η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης ήταν μεγαλύτερη από 74 %. Τα LODs ήταν μεταξύ 0,003-0,007 pg/mg και τα LOQs ήταν μεταξύ 0,011-0,021 pg/mg. Επίσης, οι Salomone et al. , ανέλυσαν και ποσοτικοποίησαν 13 συνθετικά οπιοειδή, συμπεριλαμβανομένων αναλόγων της φαιτανύλης. Η ακρίβεια και η

μεροληψία ήταν μικρότερες από 20 % και η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης ήταν μεγαλύτερη από 70 %. Τα LOD κυμάνθηκαν μεταξύ 0,1-0,3 pg/mg και τα LOQ κυμάνθηκαν μεταξύ 0,3-0,9 pg/mg. Σε σύγκριση με την παρούσα εργασία, όπου αναλύθηκαν μέχρι και 19 αυθεντικά δείγματα, οι παραπάνω ανέλυσαν μόνο δύο αυθεντικά δείγματα. Ο αριθμός των δειγμάτων δίνει πολύ μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων, παρόμοιο με εκείνο που βρέθηκε στη βιβλιογραφία.

Μία επιπλέον ανάλυση πραγματοποιήθηκε στα δείγματα με σκοπό την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση άλλων ψυχοδραστικών φαρμάκων. Το LLOQ της μεθόδου κυμάνθηκε από 6 έως 32 pg/mg. Η ηρωίνη (που ανιχνεύθηκε μέσω 6-MAM), μαζί με φαιντανύλη, ήταν η κυρίως καταναλισκόμενη ($n = 17$). Άλλα φάρμακα όπως αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, κοκαΐνη, μεθαδόνη, βουπρενορφίνη, μεπεριδίνη, οξυκωδόνη και τραμαδόλη ήταν επίσης παρόν. Στις περισσότερες περιπτώσεις, κατά μέσο όρο, περίπου 5 άλλα φάρμακα χρησιμοποιήθηκαν ταυτόχρονα με ανάλογα φαιντανύλης.



Εικ 5.: Συχνότητα κλασικών ναρκωτικών στα 17 δείγματα μαλλιών στις ΗΠΑ από χρήστες φαιντανύλης (%)

Στη παρούσα εργασία έγινε και τμηματική ανάλυση τριχών. Ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης ανάλυσης είναι ότι επιτρέπει τον προσδιορισμό του τρόπου χρήσης ναρκωτικών κατά τη διάρκεια του χρόνου. Έτσι, μπορεί κανείς να

εκτιμήσει εάν ένας χρήστης ναρκωτικών έχει αυξήσει ή μειώσει τη δόση μιας συγκεκριμένης ουσίας σε μια καθορισμένη χρονική περίοδο.

Συμπερασματικά, η μέθοδος επικυρώθηκε σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες για 16 ανάλογα φαιντανύλης στα μαλλιά. Οι ακόλουθες ενώσεις ποσοτικοποιήθηκαν για πρώτη φορά ταυτόχρονα και επικυρώθηκε η μέθοδος UHPLC-MS/MS για την ανάλυση δειγμάτων μαλλιών σε AH-7921, ακρυλ-φαιντανύλη, κροτονυ-λφαιντανύλη, U-49900, βαλερυλ-φαιντανύλη, 4φθορο-ισο-βουτυρυλφαιντανύλη, οκφετανύλη, τετραϋδροφουρανυλφαιντανύλη.

Από όσο γνωρίζουμε, είναι η πρώτη φορά που αναφέρθηκαν συγκεντρώσεις κατά μήκος των τριχών (τμηματική ανάλυση). Αξιολογήθηκαν πληροφορίες για το ιστορικό ανθρώπων που κάνουν χρήση πολλών φαρμάκων και φαιντανύλης παράλληλα, το οποίο θα μπορούσε να βοηθήσει άλλα εργαστήρια στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων τους και επίσης να αναζητήσουν συνθετικά οπιοειδή σε συγκεκριμένο πληθυσμό χρηστών ναρκωτικών. Έτσι, η ανάλυση αναλόγων φαιντανύλης και συνθετικών οπιοειδών συνιστάται στην ηρωίνη, αλλά επίσης, ακόμη και σε χρήστες ναρκωτικών που μοιάζουν να λαμβάνουν τραμαδόλη, μεθαδόνη, βουπρενορφίνη, κοκαΐνη και αμφεταμίνη. [35]

3.7 Ανίχνευση 6-μονοακετυλομορφίνης σε δείγμα μαλλιών χρηστών ηρωίνης με GC/MS

Η ηρωίνη είναι ένα ημισυνθετικό οπιούχο, η χημική της ονομασία είναι διακετυλομορφίνη (DAM) και μοιάζει δομικά με τη μορφίνη. Αν και χρησιμοποιείται ως ισχυρός αναλγητικός παράγοντας σε όλο τον κόσμο, στις ΗΠΑ, δεν χρησιμοποιείται πλέον κλινικά. Μεταβολίζεται με διαδοχική αφαίρεση των ακετυλομάδων της. Η απώλεια της πρώτης ακετυλομάδας μετατρέπει την ηρωίνη σε 6-μονοακετυλομορφίνη (6-MAM). Η 6-MAM είναι ένας πρωταρχικός μεταβολίτης της ηρωίνης και η παρουσία της αποτελεί οριστική ένδειξη κατάχρησης ηρωίνης. Όπως και η ηρωίνη, η 6-MAM έχει πολύ σύντομο χρόνο ημιζωής. Ωστόσο, η 6-MAM μεταβολίζεται περαιτέρω σε μορφίνη, τον κυρίαρχο μεταβολίτη της ηρωίνης. Η ανίχνευση της 6-μονοακετυλομορφίνης επαληθεύει την έκθεση στην ηρωίνη, αλλά αυτός ο μεταβολίτης έχει εξαιρετικά σύντομο χρόνο ημιζωής και είναι ανιχνεύσιμος στα ούρα μόνο για περίπου 8 ώρες μετά από μία εφάπαξ δόση.

Η παρούσα μελέτη διεξήχθη με στόχο την εκτίμηση του ποσοστού επιτυχίας ενός κέντρου απεξάρτησης, συγκρίνοντας τα επίπεδα της 6-MAM σε δείγματα μαλλιών σε τακτικούς χρήστες ηρωίνης και άτομα που υποβάλλονται σε αποκατάσταση. Το κριτήριο ένταξης που τέθηκε για τα άτομα στο κέντρο αποκατάστασης ήταν εκείνα που έχουν περάσει τουλάχιστον 30 ημέρες περιόδου αποκατάστασης. Η μέση διάρκεια ενός ασθενούς στο κέντρο αποκατάστασης για τη συλλογή δειγμάτων, στη μελέτη, ήταν 35 ημέρες. Τα δείγματα τρίχας από όλους τους συμμετέχοντες ελήφθησαν από το τμήμα κορυφής του κεφαλιού, προκειμένου να αποφευχθεί η ασάφεια στη διασπορά της 6-MAM στα μαλλιά, λόγω του ασταθούς ρυθμού ανάπτυξης τριχών σε διάφορα μέρη του κεφαλιού.

Περίπου, 50 mg κάθε δείγματος πλύθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, πρώτα με απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά, στη συνέχεια με ακετόνη για 1 λεπτό και τέλος με διχλωρομεθάνιο για 2 λεπτά. Το δείγμα ξηράθηκε στον αέρα και στη συνέχεια κόπηκε σε μικρά τμήματα περίπου 3-4 mm. Τα πλυμένα δείγματα επώαστηκαν με NaOH για 3 ώρες σε υδατόλουτρο στους 50°C για να καταστεί δυνατή η πέψη. Τα δείγματα στη συνέχεια εκχυλίστηκαν με μεθυλ-τριοταγής βουτυλαιθέρα (MTBE) και ακολούθησε φυγοκέντρωση. Ο διαλύτης μπήκε στη συνέχεια σε καθαρούς σωλήνες που περιείχαν 150 μl 1% μυρμηκικό οξύ, στη συνέχεια αναμίχθηκαν σε περιστροφικό αναμικτήρα για 20 λεπτά και απομακρύνθηκαν μετά από 10 λεπτά φυγοκέντρωσης με αναρρόφηση. Από το υπόλοιπο υδατικό στρώμα, ένα δείγμα 1μl εγχύθηκε στο σύστημα GC-MS.

Η στήλη ήταν HP-5 διασταυρωμένη 5% φαινυλομεθυλοπολυσιλοξάνιο fused-silica (25 m×0,32 mm × 0,17 μm). Ήλιο καθαρότητας 99,9% χρησιμοποιήθηκε ως αέριο φορέα. Η θερμοκρασία του εγχυτήρα ήταν 280°C και ο ρυθμός ροής ήταν 1 mL/min. Η θερμοκρασία του φούρνου διατηρήθηκε στους 110°C για 3 λεπτά, στους 10°C/min, ακολουθούμενη από 210 °C για 2 λεπτά στους 10°C/min και τέλος στους 300°C για 5 λεπτά στους 20°C/min.

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι τιμές γραμμικότητας, ο χρόνος έκλουσης, καθώς και τα όρια ποσοτικοποίησης σε δύο ομάδες δειγμάτων που αφορούν χρήστες και χρήστες σε απεξάρτηση.

	C (ng/mg)	t_R min	Linearity (R^2)	LOD	LLOQ
--	-----------	-----------	---------------------	-----	------

				(ng/mg)	(ng/mg)
Εξαρτημένοι	0.1-25	7.23	0.9984	0.0745	0.22
Απεξαρτημένοι	0.1-25	7.22	0.9937	0.0311	0.09

Πίνακας 8: γραμμικότητα, χρόνος έκλουσης, όρια ποσοτικοποίησης

Η ανάκτηση, ο συντελεστής διακύμανσης και η ακρίβεια φαίνονται παρακάτω, τιμές οι οποίες είναι αποδεκτές σύμφωνα με τα κριτήρια επικύρωσης της μεθόδου.

	QC (ng/ mg)	Recovery (%)	Precision (CV%) Εντός της μέρας	Accuracy (bias%) Εντός της μέρας	Precision (CV%) Ενδιάμεσα των ημερών	Accuracy (bias%) Ενδιάμεσα των ημερών
Εξαρτ.	1,5	86,84	8,1	4,7	4,9	2,9
	3	91,18	1,5	-1,2	4,6	-1,4
	6	91,78	0,8	-5,1	3,9	-4,2
Απεξ.	1.5	87,81	2,6	-8,7	6,9	1,1
	3	93,62	1,1	-1,2	3,6	-1,9
	6	90,84	0,6	-4,6	2,3	-4,8

Πίνακας 9: ανάκτηση, συντελεστής διακύμανσης ακρίβεια

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα σταθερότητας για τον εντοπισμό οποιασδήποτε πιθανής διακύμανσης λόγω του χρόνου αποθήκευσης. Τα αποτελέσματα από τα πειράματα σταθερότητας δείχνουν ότι τα δείγματα ήταν σταθερά υπό κανονικές συνθήκες αποθήκευσης. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική απώλεια της 6-MAM σε θερμοκρασία δωματίου για 10 ημέρες.

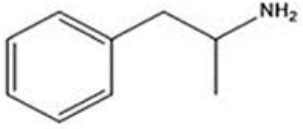
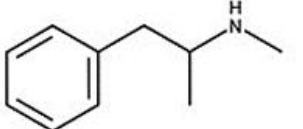
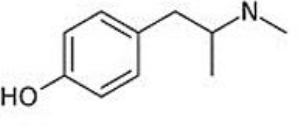
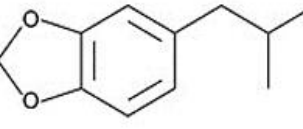
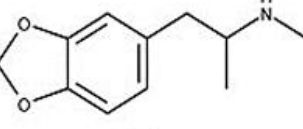
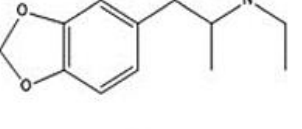
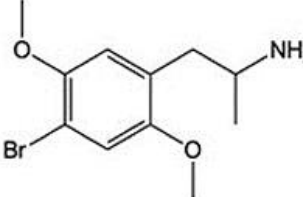
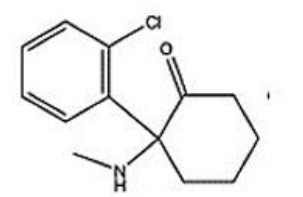
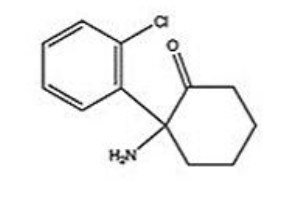
Η ομάδα των εξαρτημένων από ηρωίνη είχε μέση ηλικία 29,7 και κυρίως μαύρο χρώμα μαλλιών (75%). Η μέση διάρκεια κατάχρησης ναρκωτικών ήταν 3,3 έτη και η μέση συγκέντρωση της 6-MAM ήταν 7,815 ng/mg με όριο ανίχνευσης ήταν 0,1 ng/mg. Τα άτομα από την ομάδα αποκατάστασης είχαν μέση ηλικία 27,7 και μέση διάρκεια κατάχρησης ηρωίνης 4,8 ετών. Ο μέσος όρος συγκέντρωσης της 6-MAM ήταν 2,3445 ng/mg με όριο ανίχνευσης 0,1 ng/mg. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι εξαρτημένοι από την ηρωίνη που ανήκουν και στις δύο ομάδες είχαν παρόμοια χαρακτηριστικά,

αλλά υπήρχε μια αξιοσημείωτη διαφορά στην συγκέντρωση της 6-MAM που ανιχνεύθηκε. Είναι φανερό, πως η ομάδα με τους χρήστες σε απεξάρτηση έδειξε χαμηλότερες συγκεντρώσεις της 6-MAM, οι οποίες δηλώνουν την αποτελεσματικότητα του κέντρου απεξάρτησης.

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν επιβεβαίωσαν την παρουσία αξιοσημείωτων επιπέδων 6-MAM στο 100% των δειγμάτων, ακόμη και 30 ημέρες μετά την αποχή από την ηρωίνη. Ως εκ τούτου, με βάση προηγούμενες μελέτες, καθώς και τα αποτελέσματα της παρούσας προκύπτει ότι στους τοξικομανείς η 6-MAM παραμένει σε δείγματα μαλλιών ακόμη και μετά από 30 ημέρες αποχής. Επιπλέον, απαιτείται περαιτέρω μελέτη για τον ακριβή προσδιορισμό του χρόνου διέλευσης του μεταβολίτη της ηρωίνης στο δείγμα μαλλιών. Επίσης, σύμφωνα με τα ευρήματα της εργασίας, φανερώνεται ότι η ανάλυση τριχών για την 6-MAM μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση των χρηστών ηρωίνης από άλλους τύπους έκθεσης σε οπιούχα (π.χ. σπόροι παπαρούνας, νόμιμη μορφίνη και κωδεΐνη). [36]

3.8 Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου GC-MS για τον προσδιορισμό διεγερτικών τύπου αμφεταμίνης και κεταμίνης σε ανθρώπινα μαλλιά

Τα διεγερτικά τύπου αμφεταμίνης (ATSs) όπως αμφεταμίνη (AM), μεθαμφεταμίνη (MA), 3,4-μεθυλενοδιοξυαμφεταμίνη (MDA), 3,4-μεθυλενοδιοξυμεθαμφεταμίνη (MDMA), 3,4-μεθυλενοδιοξυαιθυλαμφεταμίνη (MDEA), παρα-μεθοξυαμφεταμίνη (PMA), 4βρωμο-2,5-διμεθοξυαμφεταμίνη (DOB), κεταμίνη (KET), και νορκεταμίνη (NKT) είναι φάρμακα που διεγείρουν το κεντρικό νευρικό σύστημα προκαλώντας παραισθήσεις. Οι έφηβοι είναι οι βασικοί χρήστες των παραγώγων της αμφεταμίνης, συνεπώς είναι απαραίτητη ανάγκη η ύπαρξη μεθόδου για τον έλεγχο της χρήσης ναρκωτικών.

 Amphetamine (AM)	 Methamphetamine (MA)	 para-Methoxy amphetamine (PMA)
 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDA)	 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA)	 3,4-Methylenedioxyethylamphetamine (MDEA)
 4-Bromo-2,5-dimethoxyamphetamine (DOB)	 Ketamine (KET)	 Norketamine (NKT)

Εικ. 6 Χημική δομή των ATSS

Τα ATSS φαίνεται ότι συσσωρεύονται στα μαλλιά για τρεις με πέντε μήνες. Έχουν υπάρξει πολλές αναφορές σχετικά με την ανάλυση των ATSS, της κεταμίνης και των οπιούχων στα μαλλιά. Ωστόσο, οι περισσότερες αναφορές περιέγραψαν μόνο την ανάλυση ενός ή μερικών από τα προαναφερθέντα φάρμακα. Έτσι, ο στόχος αυτής της μελέτης είναι να αναπτύξει μια ευαίσθητη μέθοδο GC/MS για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των ναρκωτικών, συμπεριλαμβανομένων των 7 ATSS και της κεταμίνης μαζί με τον μεταβολίτη της νορκεταμίνης.

Ληφθήκαν δείγματα τόσο από χρήστες αμφεταμίνης, όσο και από ανθρώπους που δεν έχουν χρησιμοποιήσει. Περίπου 10 mg τρίχας ζυγίστηκαν με ακρίβεια και μεταφέρθηκαν σε σωλήνα προκειμένου να πραγματοποιηθεί εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE). Η έκπλυση των τριχών έγινε με νερό και μεθανόλη. Οι τρίχες κονιοποιήθηκαν και προστέθηκε σε αυτές εσωτερικό πρότυπο, μεθανόλη και υδροχλωρικό οξύ. Αφέθηκε για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε άλλο σωλήνα και ξηράνθηκε χρησιμοποιώντας ροή αζώτου. Το υπόλειμμα διαλύθηκε σε 3 mL φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος pH 6,0, 1 M και καθαρίστηκε με SPE.

Το δείγμα εκλούστηκε με μείγμα οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης και αμμωνίας (80:18:2, v/v/v) με ταχύτητα 2 mL/min. Το έκλουσμα μεταφέρθηκε σε γυάλινο σωλήνα με καπάκι, προστέθηκε διάλυμα υδροχλωρικού οξέος σε μεθανόλη (1:99, v/v) και ξηράνθηκε με ρεύμα αζώτου. Ακολούθησε παραγωγοποίηση των αναλυτών με προσθήκη οξικού αιθυλεστέρα και επταφθοροβουτυρικό ανυδρίτη (HFBA), μετά από επώαση στους 80°C για 40 λεπτά. Το μίγμα αντίδρασης εξατμίστηκε υπό ρεύμα αζώτου και ανασυστάθηκε με 100 μ L αιθυλοξικού οξέος. Ένα (1 μ l) του διαλύματος δείγματος εγχύθηκε στο όργανο GC/MS.

Το GC-MS εκτελέστηκε με ένα σύστημα αεριοχρωματογραφίας σε συνδυασμό με ένα φασματόμετρο μάζας MS στα 70 eV, με ιοντισμό πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (EI). Το ήλιο χρησιμοποιήθηκε ως φορέας, με ρυθμού ροής 1,0 mL/min. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε λειτουργία χωρίς διαχωρισμό. Η αρχική θερμοκρασία του φούρνου στήλης ήταν από 80°C έως 280°C. Οι αναλύτες προσδιορίστηκαν με έγχυση τυποποιημένων διαλυμάτων και εσωτερικών τυποποιημένων διαλυμάτων. Η έξοδος δεδομένων επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας τη λειτουργία σάρωσης (SCAN) για αναγνώριση και επιλεγμένη λειτουργία παρακολούθησης ιόντων (SIM) για ποσοτικοποίηση χρησιμοποιώντας χαρακτηριστικά ιόντα.

Η μέθοδος επικυρώθηκε με τις ακόλουθες παραμέτρους: ειδικότητα, εύρος γραμμικότητας, LOD, LOQ, ανάκτηση, συντελεστή διακύμανσης και ακρίβεια. Ο πίνακας παρουσιάζει το εύρος γραμμικότητας, τα δεδομένα των LOD και LOQ. Η καμπύλη βαθμονόμησης κατασκευάστηκε με 6 σημεία για 9 ενώσεις. Κάθε συγκέντρωση εγχύθηκε τρεις φορές. Ο συντελεστής R^2 ήταν μεγαλύτερος από 0,9971 για όλους τους αναλύτες που έδειξαν καλή γραμμικότητα. Η ευαισθησία της μεθόδου αξιολογήθηκε με προσδιορισμό LOD και LOQ κάθε αναλύτη. Τα LOD και LOQ εμπίπτουν στο εύρος των 0,02-0,10 ng/mg και 0,07-0,32 ng/mg, αντίστοιχα.

ΟΥΣΙΑ	ΕΥΡΟΣ ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑΣ (ng/mg)	R ²	LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)
AM	0,5-40,0	0,9990	0,07	0,23
MA	0,5-40,0	0,9981	0,04	0,12
PMA	0,5-40,0	0,9991	0,05	0,17
MDA	0,5-40,0	0,9993	0,10	0,32
MDMA	0,5-40,0	0,9971	0,05	0,18
MDEA	0,5-40,0	0,9987	0,02	0,07
DOB	0,5-40,0	0,9985	0,06	0,21
KET	0,5-40,0	0,9982	0,03	0,09
NKT	0,5-40,0	0,9990	0,05	0,18

Πίνακας 10 : Γραμμικότητα, όριο ανίχνευσης (LOD) και όριο ποσοτικοποίησης (LOQ)

Η ανάκτηση των αμφεταμινών και της κεταμίνης σε χαμηλή, μεσαία και υψηλή συγκέντρωση ήταν μεταξύ εύρους 75.18-89.30% με τυπική απόκλιση RSD κάτω από 15%. Ο συντελεστής διακύμανσης εντός της μέρα και ενδιάμεσα των ημερών ήταν από 93,63% έως 112,4% και από 94,70% έως 110,20%, αντίστοιχα. Η ακρίβεια εντός και μεταξύ των ημερών (%RSD) ήταν 8,72 και 9,73%, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα επικύρωσης απέδειξαν ότι η μέθοδος GC-MS μπορεί να εφαρμοστεί για την ανάλυση των αναλυτών σε δείγματα πραγματικών δειγμάτων μαλλιών.

Η ανάλυση των ναρκωτικών σε βιολογικά δείγματα έχει μεγάλη σημασία για τη ταυτοποίηση του χρήστη ναρκωτικών. Οι τρίχες χρησιμοποιούνται όλο και πιο συχνά για δοκιμές φαρμάκων, αφού μπορούν να διασαφηνίσουν το μακρύ ιστορικό πρόσληψης ναρκωτικών σε σύγκριση με τα βιολογικά υγρά. Η περιεκτικότητα των ναρκωτικών στα μαλλιά είναι συνήθως πολύ χαμηλή, επομένως είναι απαραίτητο να αναπτυχθεί μια κατάλληλη αναλυτική διαδικασία που να είναι αποτελεσματική ακόμα και σε τόσο χαμηλό επίπεδο συγκεντρώσεων. Η διαδικασία SPE-GC-MS εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό των ναρκωτικών, συμπεριλαμβανομένων των AM, MA, MDA, MDMA, MDEA, PMA, DOB, KET και NKT λόγω της απλότητας, της πρακτικότητας και της ευαισθησίας τους. Η κεταμίνη και η νορκεταμίνη ανιχνεύθηκαν καλά, οι

υπόλοιπες ουσίες χρειάστηκαν παραγωγοποίηση καθώς ήταν δύσκολο να ανιχνευθούν. Η διαδικασία αυτή μετατρέπει τις ενώσεις σε πιο πτητικές και σταθερές ενώσεις.

Τα αποτελέσματα των παραμέτρων καταλληλότητας του συστήματος, όπως ο χρόνος συγκράτησης και η περιοχή αιχμής με RSD μικρότερη από 2,0%, έδειξαν την ακρίβεια του οργάνου που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανάλυση ρουτίνας. Η μέθοδος δείχνει την υψηλή ειδικότητά της με το καλό σχήμα κορυφής για όλους τους αναλύτες. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, η μέθοδος αποδείχθηκε αποτελεσματική για τον εντοπισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των προαναφερθέντων εννέα ναρκωτικών. [37]

3.9 Ποιοτικός καθορισμός αμφεταμινών, κοκαΐνης και οπιοειδών στην ανθρώπινη τρίχα μέσω αέριας χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας

Η ανάλυση του τριχώματος είναι ένα αξιόπιστο εργαλείο για την απόδειξη χρόνιας χρήσης ή μη ναρκωτικών ουσιών. Οι περισσότερες εργασίες που αφορούν την ανάλυση τριχώματος αφορούν κυρίως την κοκαΐνη, ακολουθούμενη από τα οπιοειδή και της αμφεταμίνες. Η εργασία αυτή περιγράφει πως χρησιμοποιήθηκε GC/MS για να αξιολογηθούν τα επίπεδα μορφίνης, κωδεΐνης, ηρωίνης, 6-ακετυλμορφίνης, κοκαΐνης, μεθαδόνης, αμφεταμίνης, μεθαμφεταμίνης, MDA, MDMA, MDEA στη τρίχα.

Οι τρίχες συλλέχθηκαν από 36 νεαρά άτομα ηλικίας 16-22 ετών. Τα περισσότερα από αυτά βρέθηκαν θετικά σε έλεγχο χρήσης ναρκωτικών ουσιών. Στη Κροατία, οι αναλύσεις για χρήση ναρκωτικών σε τρίχα γίνονται μόνο στο ινστιτούτο μας και τα άτομα αυτά προέρχονται από τοπικά κέντρα κατά της χρήσης ναρκωτικών. Μια τρίχα έχει διάμετρο περίπου 5 χιλιοστά, διπλώνεται σε αλουμινόχαρτο, και οριοθετούνται τα άκρα της τρίχας. Αναλύθηκαν δείγματα μήκους 2-4 εκατοστών.

Η τρίχα πλύθηκε δυο φορές σε διχλωρομεθάνιο για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα στέγνωσε και κόπηκε σε πολύ μικρά κομμάτια μικρότερα από 1 χιλιοστό και 50 mg χρησιμοποιούνται για ανάλυση. Δεν κατέστη δυνατή η ανάλυση για όλα τα ναρκωτικά ταυτόχρονα. Χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη (2ml) ως διαλύτης εκχύλισης και 200 ng μεθακουλόνης σε διάλυμα μεθανόλης 2μg/ml, ως διάλυμα εσωτερικού πρότυπου. Τα παραπάνω προστέθηκαν σε 50 mg τρίχας σε δοκιμαστικό σωλήνα 10

ml. Η μεθανόλη έπειτα συλλέχθηκε, και οι εναπομείνουσες τρίχες ξεπλύθηκαν με 0,5 ml μεθανόλης, και τα δυο τμήματα αφυδατώθηκαν εντελώς σε 40 βαθμούς Κελσίου υπό ρεύμα αζώτου.

Κατά την εκχύλιση στερεάς φάσης χρησιμοποιήθηκαν 2 ml μεθανόλης και 2ml από ρυθμιστικό διάλυμα φωσφόρου με pH=6. Μετά την εξάτμιση της μεθανόλης, το στερεό υπόλειμμα της τρίχας προστέθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφόρου με pH=6 και το μείγμα αυτό τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες τύπου Bond Elut. Μετά προστέθηκαν 2 ml απιονισμένου νερού, 1ml οξικού οξέος και 2 ml μεθανόλης με αυτή τη σειρά. Έπειτα, οι σωλήνες στέγνωσαν σε συνθήκες κενού για 5 λεπτά και έγινε έγχυση με 1 ml μείγματος διχλωρομεθανίου- 2 προπανόλης- υδροξείδιο της αμμωνίας. Έπειτα αυτό το μείγμα συλλέχθηκε σε γυάλινους σωλήνες και εξατμίστηκε σε θερμοκρασία 40 βαθμών Κελσίου υπό ρεύμα αζώτου.

1 ml υδροξειδίου του νατρίου προστίθεται σε κάθε 50 gr δείγματος τρίχας. Τα δείγματα υδρολύονται για 20 λεπτά στους 70 βαθμούς και ψύχονται. Ακολουθεί εκχύλιση 1ml με οξικό εθυλεστέρα και εξάτμιση με την παρουσία ενός μείγματος 100ml μεθανόλης/υδροχλωρικού οξέος. 50 μικρολίτρα οξικού εθυλεστέρα και 50 ml HFBA προστέθηκαν στα στερεά υπολείμματα και οι δοκιμαστικοί σωλήνες ασφαλίστηκαν, μπήκαν σε δίνη και θερμάνθηκαν στους 60°C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια ακολούθησε εξάτμιση, αναδόμηση σε 100ml οξικού εθυλεστέρα και ανάλυση μέσω αέριας χρωματογραφίας/φασματομετρίας μάζας. Κάθε ένα από αυτά τα δείγματα περιλάμβανε δείκτες για ανίχνευση ναρκωτικών ουσιών.

Τα αρχικά διαλύματα περιείχαν 2mg/ml (Α) θειϊκή μορφίνη, κωδεΐνη, υδροχλωρίδιο ηρωΐνης, 6-ακετυλμορφίνης και υδροχλωριδίου κοκαΐνης και (Β) αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, MDA, MDMA και MDEA, είχε γίνει προεργασία σε μεθανόλη και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -20°C. Οι καμπύλες ρύθμισης δημιουργήθηκαν μέσω των μεθόδων που περιγράφηκαν παραπάνω, χρησιμοποιώντας 20, 50, 100, 200, 400 και 80ng του αρχικού διαλύματος (Α) ή (Β), 200ng μεθακουαλόνης και 50mg ρυθμιστικού δείγματος τρίχας, το οποίο είχε καθαριστεί και κοπεί σε πολύ μικρά κομμάτια. Τα ρυθμιστικά αυτά δείγματα τρίχας είχαν βρεθεί από συνεργάτες του εργαστηρίου. Το όριο ανίχνευσης είχε αποφασιστεί μέσω μείωσης των συγκεντρώσεων των δειγμάτων.

Η ανάλυση έγινε με αέρια χρωματογραφία και φασματομετρία μαζών με ανιχνευτή ιόντων (MSD, mass selective detector). Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε περιείχε 5% διφαινυλ-95% διμεθυλ πολυσιλοξάνη, με διαστάσεις 30 m* 0,25 mm. Για την ανάλυση της μορφίνης, της κωδεΐνης, της ηρωΐνης, της 6-ακετυλμορφίνης, της μεθαδόνης και της κοκαΐνης, η θερμοκρασία των 50 βαθμών χρησιμοποιήθηκε για 1 λεπτό, μετά ρυθμίστηκε στους 300 βαθμούς με 50 βαθμούς/λεπτό και διατηρήθηκε εκεί για 6 λεπτά. Για την ανάλυση της αμφεταμίνης, της μεθαμφεταμίνης, MDA, MDMA, MDEA, η θερμοκρασία των 50°C διατηρήθηκε για 1 λεπτό, μετά ρυθμίστηκε στους 225 °C με 20 °C /λεπτό και διατηρήθηκε για 1 λεπτό, έπειτα στους 260°C με 50°C /λεπτό και διατηρήθηκε για 1 λεπτό. Ως φορέας-αέριο χρησιμοποιήθηκε καθαρό ήλιο σε ρυθμό ροής περίπου 1μλ/λεπτό. Η αρχική θερμοκρασία των 40°C διατηρήθηκε για 0,1 λεπτά, μετά ρυθμίστηκε στους 280°C με 200°C /λεπτό και διατηρήθηκε για 8 λεπτά. Παρακάτω φαίνονται οι αναλυτικές παράμετροι για τις ουσίες που αναλύθηκαν.

ΟΥΣΙΑ	RSD (%)	Ακρίβεια (%)	LoD (ng/mg)
Μεθαδόνη	6,9	87,5	0,30
Κοκαΐνη	16,1	96,3	0,20
Κωδεΐνη	8,2	100,6	0,10
Ηρωΐνη	12,6	91,3	0,20
6- MAM	6,5	98,8	0,05
Μορφίνη	6,3	99,4	0,10
Αμφεταμίνη	7,8	88,0	0,20
Μεθαμφεταμίνη	5,2	97,2	0,05
MDA	8,3	85,1	0,20
MDMA	5,0	90,6	0,10
MDEA	7,0	86,3	0,15

Πίνακας 11 : Αναλυτικές παράμετροι

Υπάρχουν πολλές παρόμοιες μέθοδοι GC/MS, αν και οι περισσότερες διαφέρουν στη διαδικασία πλύσης και εκχύλισης. Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε η έκπλυση των δειγμάτων να γίνει δύο φορές με διχλωρομεθάνιο. Η μεθανόλη αποδεικνύεται ο

διαλύτης εκλογής για την εκχύλιση ηρωίνης και 6-ακετυλομορφίνης. Οι Kintz και Cirimele διαπίστωσαν ότι οι καλύτερες ανακτήσεις για αμφεταμίνη, MDA και MDMA παρατηρήθηκαν μετά από αλκαλική υδρόλυση των μαλλιών.

Μετά από εξέταση διαφόρων αντιδραστηρίων παραγωγοποίησης, διαπιστώθηκε ότι ένα μείγμα επταφθοροβουτυρικό ανυδρίτη (HFBA), ήταν πολύ καλύτερο από το N,O-δισ(τριμεθυλοσιλυλ) τριφθοροακεταμίδιο (BSTFA). Συγκεκριμένα τα παράγωγα του ανυδρίτη ήταν πολύ σταθερά, χωρίς να μειώνεται η ικανότητα ανάλυσης, καθώς το αντιδραστήριο εξατμίζεται πριν απ' αυτήν. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναπαραγόμενες, ακριβείς και ευαίσθητες. Οι εφαρμοσμένες αυτές μέθοδοι επιβεβαίωσαν την κατανάλωση ηρωίνης σε 18 άτομα βασιζόμενα σε θετικά ευρήματα 6-ακετυλμορφίνης. Ανάμεσα σε αυτά τα 18 άτομα, ανιχνεύθηκε μεθαδόνη σε 4, MDMA σε 2 και κοκαΐνη σε 2. Η κοκαΐνη ως κύρια ουσία ήταν παρούσα σε δυο άτομα, η μεθαδόνη σε δυο, η μεθαμφεταμίνη σε δυο και MDMA σε 7 από τα 36 άτομα. Σε δυο από τα 9 άτομα με βαμμένα μαλλιά, δεν ανιχνεύθηκε κάποια ναρκωτική ουσία. Παρ'όλο τον μικρό αριθμό των δειγμάτων, η μελέτη αυτή ήταν ικανή να αναδείξει την αυξανόμενη τάση χρήσης ναρκωτικών σε νεαρά άτομα στην Κροατία. [38]

4^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η ανάκτηση ουσιών από δείγμα τριχών είναι από τα πιο σημαντικά βήματα κατά την ανάλυση αυτών. Οι ουσίες ενώνονται σταθερά στη δομή της τρίχας και εν μέρει συνδέονται με πρωτεΐνες, μελανίνη και λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης. Η απόδοση της εκχύλισης εξαρτάται από τη δομή του φαρμάκου, τον τρόπο σύνδεσης, την κατάσταση της τρίχας και από τη πολικότητα του διαλύτη. Στις περισσότερες περιπτώσεις, ο διαλύτης της εκχύλισης είναι η μεθανόλη. Η διάλυση με υδροξείδιο του νατρίου παρέχει υψηλές ανακτήσεις σε αλκαλικές σταθερές ουσίες, όπως είναι τα κανναβινοειδή ή αμφεταμίνες. Παρακάτω, παρουσιάζεται πίνακας που παραθέτει συνοπτικά τις τεχνικές προετοιμασίας δειγμάτων των εργασιών που παρουσιάστηκαν στο τρίτο κεφάλαιο. [39]

Τρόπος προετοιμασίας	Ουσίες που εκχυλίστηκαν	Αριθμός αναφοράς	Σχόλια
SPE Δ/τες: MeOH, NH ₄ OH	Κοκαΐνη BZE CE	30	<ul style="list-style-type: none"> ○ Καλή μέθοδος ○ Ανακτήθηκαν όλες οι ουσίες
SPE Δ/τες: MeOH	CBN THC CBD THCCOOH OHTHC	31	<ul style="list-style-type: none"> ○ Καλή μέθοδος ○ Υψηλή ανάκτηση ○ Υψηλή ακρίβεια
SPE Δ/τες: ρυθμιστικό φωσφορικών	AP MA MOR COD 6-AM 6-AC	32	<ul style="list-style-type: none"> ○ Αποτελεσματική ○ Ικανοποιητική ανάκτηση ουσιών
SPE Δ/τες: MeOH LLE Δ/τες: NaOH	THC	33	<p>LLE:</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ πιο καλά αποτελέσματα ○ Ικανοποιητική ○ Γρήγορη ○ Ευαίσθητη ○ Πιο απλή
MAX Δ/τες: MeOH	EtG CE BZE	34	<ul style="list-style-type: none"> ○ Καλύτερη ανάκτηση ○ Μειωμένη επίδραση μήτρας
SPE Δ/τες: MeOH	Norfentanyl Methoxyacetylfentanyl Acetylfentanyl Ocfentanyl Tetrahydrofuranylfentanyl	35	Καλά αποτελέσματα, εκτός από νορφεντανύλιο και αμλφεντανύλιο

	<p>Acrylfentanyl U-47700 Fentanyl Alfentanyl AH-7921 U-49900 Furanylfentanyl Crotonylfentanyl Butyrylfentayl 4-Fluoro-iso-butyryl fentanyl Valerylfentanyl</p>		
Εκχύλιση με MTBE	6-MAM	36	<ul style="list-style-type: none"> ○ Καλή ανάκτηση ○ Οικονομική ○ Ξεχωρίζει χρήστες ηρωίνης από άλλα οπιούχα
<p>SPE Δ/τες: MeOH</p>	<p>AM MA PMA MDA MDMA MDEA DOB KET NKT</p>	37	<ul style="list-style-type: none"> ○ Απλή ○ Αποτελεσματική ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις ○ Πρακτική, ευαίσθητη
<p>SPE Δ/τες: MeOH</p>	<p>Μεθαδόνη Κοκαΐνη Κωδεΐνη Ηρωίνη 6- MAM Μορφίνη Αμφεταμίνη</p>	38	Καλή ανάκτηση, ειδικά για αμφεταμίνη, MDA, MDMA

	Μεθαμφεταμίνη MDA MDMA MDEA		
--	--------------------------------------	--	--

Πίνακας 12: Συνοπτικό πίνακας για τρόπους εκχύλισης

Σύμφωνα με τον πίνακα, αλλά και με τη βιβλιογραφία, η πιο χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι η SPE, με διαλύτη μεθανόλη. Ουσίες που είναι ασταθείς δεν μπορούν να παραληφθούν με αλκαλική διάλυση. Επίσης, ούτε βενζοδιαζεπίνες, αμφεταμίνη και κοκαΐνη μπορούν να ανακτηθούν αλκαλικά. Η μεθανόλη είναι ο κατάλληλος διαλύτης για να παραληφθούν οι αναλύτες, κάνοντας τη τεχνική απλή και αποδοτική για εκχύλιση ημι-πτητικών και μη πτητικών ουσιών. Τέλος, η επιλογή της SPE ως μέθοδος εκχύλισης, οφείλεται επίσης στο χαμηλό κόστος και στη δυνατότητα αυτοματοποίησης.

Ουσίες που αναλύθηκαν	Τεχνική ή	Όρια ανίχνευσης	Αρ. Αναφ.	Σχόλια
Κοκαΐνη BZE CE	GC/MS	LOD (ng/mg) ○ COC: 0,015 ○ BZE: 0,015 ○ CE: 0,025 LOQ (ng/mg) ○ COC: 0,2 ○ BZE: 0,2 ○ CE: 0,05	30	○ R ² > 0,99 ○ Θέλει παραγωγή γοποίηση ○ Εκχυλίστηκαν όλες οι ουσίες
CBN THC CBD THCCOOH diOHTHC	LC-MS/MS	LOQ=40 pg/mg LOD=40 pg/mg (εκτός από diOHTHC, που ήταν 100 pg/mg)	31	○ Υψηλή ακρίβεια ○ Μεγαλύτερη ακρίβεια σε δείγματα τριχών, απ' ό,τι σε νύχια

AP MA MOR COD 6-AM 6-AC	LC-MS	LOD (pg/mg): <ul style="list-style-type: none"> AP: 2 MA: 2 MOR: 8 COD: 8 6-AM: 8 6-AC: 8 LOQ (pg/mg): 10	32	LC αντικατέστησε GC, γιατί δεν χρειάζεται παραγωγοποίηση, δίνει χαμηλότερα LOD, LOQ και πραγματοποιείται ταυτόχρονη ανάλυση ουσιών και μεταβολιτών
THC	LC-MS3	LOQ: 0,1 pg/mg	33	<ul style="list-style-type: none"> Γρήγορη Απλοποιημένη Εξαιρετικά ευαίσθητη Αντικατέστησε GC/MS
EtG CE BZE	LC-MS/MS	LOD (pg/mg): <ul style="list-style-type: none"> EtG: 2 COC: 0,5 CE: 2 BZE: 0,3 LOQ (pg/mg): <ul style="list-style-type: none"> EtG: 7 COC: 2 CE: 10 BZE: 1 	34	Γρήγορη και ταυτόχρονη ανάλυση
Norfentanyl Methoxyacetylfe ntanyl Acetylfentanyl Ocfentanyl	UPLC-MS/MS	LOD: 0,1-0,3 pg/mg LOQ: 0,3-0,9 pg/mg	35	<ul style="list-style-type: none"> Γρήγορη, αποτελεσματική μέθοδος Τα αποτελέσματα

<p>Tetrahydrofuran ylfentanyl Acrylfentanyl U-47700 Fentanyl Alfentanyl AH-7921 U-49900 Furanylfentanyl Crotonylfentanyl Butyrylfentanyl 4-Fluoro-iso- butyryl fentanyl Valerylfentanyl</p>				<p>ήταν ικανοποιητικά με RSD <15% για όλες τις ενώσεις εκτός από το νορφεντανύλιο (22%) και το αλφεντανύλιο (19%)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Ανίχνευση τρόπου και χρόνου χρήσης ουσιών
6-MAM	GC/MS	<p>LOD (ng/mg)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Εξαρ: 0,0745 ○ Απεξ: 0,0311 <p>LOQ (ng/mg)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Εξαρ: 0,22 ○ Απεξ: 0,04 	36	<ul style="list-style-type: none"> ○ Απλή, ευαίσθητη ○ R² > 0.99 ○ Διάκριση χρηστών ηρωίνης από άλλα οπιοειδή
<p>AM MA PMA MDA MDMA MDEA DOB KET NKT</p>	GC/MS	<p>LOD (ng/mg):</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ AM: 0,07 ○ MA: 0,04 ○ PMA: 0,05 ○ MDA: 0,10 ○ MDMA: 0,05 ○ MDEA: 0,02 ○ DOB: 0,06 ○ KET: 0,03 ○ NKT: 0,05 <p>LOQ (ng/mg):</p>	37	<ul style="list-style-type: none"> ○ Απλή ○ Πρακτική ○ Ευαίσθητη μέθοδος <p>Κεταμίνη, νορκεταμίνη: καλή ανίχνευση</p> <p>Οι υπόλοιπες ουσίες χρειάστηκαν παραγωγοποίηση</p>

		<ul style="list-style-type: none"> ○ AM: 0,23 ○ MA: 0,12 ○ PMA: 0,17 ○ MDA: 0,32 ○ MDMA: 0,18 ○ MDEA: 0,07 ○ DOB: 0,21 ○ KET: 0,09 ○ NKT: 0,18 		RSD<2.0%: ακρίβεια οργάνου, ανάλυση ρουτίνας
Μεθαδόνη Κοκαΐνη Κωδεΐνης Ηρωίνη 6- MAM Μορφίνη Αμφεταμίνη Μεθαμφεταμίνη MDA MDMA MDEA	GC/MS	LOD (ng/mg) <ul style="list-style-type: none"> ○ Μεθαδόνη: 0,30 ○ Κοκαΐνη: 0,20 ○ Κωδεΐνη: 0,10 ○ Ηρωίνη: 0,20 ○ 6- MAM: 0,05 ○ Μορφίνη: 0,10 ○ Αμφεταμίνη: 0,20 ○ Μεθαμφεταμίνη: 0,05 ○ MDA: 0,20 ○ MDMA: 0,10 ○ MDEA: 0,15 	38	<ul style="list-style-type: none"> ○ Αναπαραγόμενη ○ Ακριβής ○ Ευαίσθητη

Πίνακας 13: Συνοπτικό πίνακας χρωματογραφικών τεχνικών

Από τον παραπάνω πίνακα και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, είναι φανερό ότι η LC αποτελεί γρήγορη, ευαίσθητη και οικονομική μέθοδος για την ανάλυση τριχών. Ειδικότερα η LC/MS αποτελεί μέθοδο με υψηλή επιλεκτικότητα και ευαισθησία.

Βιβλιογραφία

1. Bilgen Erdoğan, Anatomy and Physiology of Hair, p. 14-15, 2017
2. Hair follicle-en.svg, wikipedia
3. Myles H., Lawrence F. Brass, The national MD-PhD program outcomes study: Outcomes variation by sex, race, and ethnicity, JCI Insight, vol. 4(19), 2019
4. Hirt P., Paus R., Healthy Hair (Anatomy, Biology, Morphogenesis, Cycling, and Function), p.1-3, 2019
5. Wang W., Ramos R., Kang-Yu Tai, Studying Hair Growth Cycle and its Effects on Mouse Skin, J Invest Dermatol, vol.143(9), p. 1638-1645, 2023
6. Buffoli B., Rinaldi F., Labanca M., Sorbellini E., Trink A., Guanziroli E., The human hair: From anatomy to physiology. Int J Dermatol., vol. 53(3), p.331–41, 2014
7. Audrey G., Cooper A., Anatomy and Physiology of Hair, and Principles for its Collection, Hair Analysis in Clinical and Forensic Toxicology, Pages 1-22, 2015
8. Prota G. Melanins, Melanogenesis and melanocytes: looking at their functional significance from the chemist's viewpoint, Pigment Cell Res., vol.13, p283-93, 2000
9. Chatterton C., Chapter 3 - External Contamination: Still a Debate? Hair Analysis in Clinical and Forensic Toxicology, p. 47-70, 2015
10. Nielsen M., Johansen S., Internal quality control samples for hair testing, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol 188:113459, 2020
11. Forshufvud S, Smith H, Wassen A. Arsenic content of Napoleon I's hair probably taken immediately after his death. Nature, vol.192, p.103–105,1961
12. Rotolo M., Pacifici R., Pellegrini M., Cardullo S., Hair Testing for Classic Drugs of Abuse to Monitor Cocaine Use Disorder in Patients Following Transcranial Magnetic Stimulation Protocol Treatment, Biology (Basel), vol.10(5), p. 403, 2021
13. Usman M., Naseer A., Baig Y., Forensic toxicological analysis of hair: a review, Egyptian Journal of Forensic Sciences, vol. 9, article number 17, 2019

14. Garg U, Cooley C., Testing of Drugs of Abuse in Oral Fluid, Sweat, Hair, and Nail: Analytical, Interpretative, and Specimen Adulteration Issues, Critical Issues in Alcohol and Drugs of Abuse Testing (Second Edition), p. 405-427, 2019
15. Regal P, Nebot C, Vazquez BI, et al. Determination of the hormonal growth promoter 17alpha-methyltestosterone in food-producing animals: bovine hair analysis by HPLC-MS/MS. Meat Sci., vol.84, p.196–201, 2010
16. Pragst F., Pitfalls in hair analysis, 2004
17. Kintz P., Value of the concept of minimal detectable dosage in human hair, Forensic Sci Int, vol.218, p.28–30, 2012
18. Pragst F, Rothe M, Spiegel K, Sporkert F., Illegal and therapeutic drug concentrations in hair segments -a timetable of drug exposure, Forensic Sci Rev., vol.10/2, p.81–111, 1998
19. Agius R., Kintz P., Drug and Alcohol Testing in Hair, Collection and Analysis, European Workplace Drug Testing Society, 2010
20. Kintz P., Drug Testing in Hair, Drug Testing in Alternate Biological Specimens, p 67–8, 2019
21. Cooper G., Kronstrand R., Kintz P., Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair, Forensic Sci Int., vol.218(1-3), p.20-4, 2012
22. Society of Hair Testing, Recommendations for hair testing in forensic cases, www.soht.org, 2024
23. Nakahara Y, Hair analysis for abused and therapeutic drugs, J Chromatogr B Biomed Sci Appl., vol.733(1-2), p161-80, 1999
24. Srogi K., Hair Analysis as Method for Determination of Level of Drugs and Pharmaceutical in Human Body: Review of Chromatographic Procedures, Analytical Letters, vol.39, p.231-58, 2006
25. SCOOG HOLLER NIEMAN, Αρχές ενόργανης ανάλυσης, σελ. 816-838, 2005
26. Hegstad S., Khiabani H. Z., Kristoffersen L., Kunøe N., Lobmaier P. P., Christophersen A. S., Drug screening of hair by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, J Anal Toxicol., vol. 32(5), p.364-72, 2008

27. Yan H., Xiang P., Shen M., Current status of hair analysis in forensic toxicology in China, *Forensic Sci Res.*, vol.6(3), p.240–249, 2021
28. Agiusa R., Kintz P., Guidelines for European workplace drug and alcohol testing in hair, *Drug Test. Analysis*, vol.2, p.367–376, 2010
29. Laboratory and Scientific Section UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME Vienna, Guidelines for Testing Drugs under International Control in Hair, Sweat and Oral Fluid, 2014
30. Suárez-García A., Álvarez-Freire I., Bermejo-Barrera A.M., Duration of detection of cocaine and metabolites in hair after discontinuation of abuse, *Microchemical Journal*, vol. 153, 2020
31. Cobo-Golpe M., Cruz A., Lendoiro E., Determination, and distribution of cannabinoids in nail and hair samples, Published by Oxford University Press on behalf of Society of Forensic Toxicologists, 2020
32. Liu H.C, Liu R.H., Lin D., Simultaneous Quantitation of Amphetamines and Opiates in Human Hair by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology*, p.1-9, 2015
33. Hehet P., Franz T., Kunert N., Musshoff F., Fast and highly sensitive determination of tetrahydrocannabinol (THC) metabolites in hair using liquid chromatography-multistage mass spectrometry (LC–MS3), *DRUG TESTING AND ANALYSIS*, vol.14, p.1614-22, 2022
34. Shin D., Kim S.Y., Simultaneous determination of ethyl glucuronide, cocaine, cocaethylene, and benzoylecgonine in hair by using LC–MS/MS, *Journal of Analytical Science and Technology*, vol. 15, 2024
35. Fernández M., Willea S., Jankowskib D., Development of an UPLC–MS/MS method for the analysis of 16 synthetic opioids in segmented hair, and evaluation of the polydrug history in fentanyl analogue users, *Forensic Science International*, vol.307, 2020
36. Ghauri M.A., Hassan F., Hassan Y., Detection of 6-monoacetylmorphine in hair sample of heroin addicts using gas chromatography–mass spectrometry and

significance of rehabilitation program, Future Journal of Pharmaceutical Sciences, vol.7, 2021

37. Tran Viet Hung, Ha Minh Hien, Development and validation of a GC-MS method for determination of amphetamine-type stimulants and ketamine in human hair, Pharm Sci Asia, vol.50, p.24-33, 2023

38. Skender L., Karacic V., Quantitative determination of amphetamines, cocaine, and opiates in human hair by gas chromatography/mass spectrometry, Forensic Science International, 2002

39. Musshoff F., Madea B., New trends in hair analysis and scientific demands on validation and technical notes, Forensic Science International 165, p. 204–215, 2007

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.